

**MODELLUNTERSUCHUNGEN ZUR
PYRUVATBILDUNG DURCH
PSYCHROTROPHE MIKROORGANISMEN**

Waltraud Arold

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan

Modelluntersuchungen zur Pyruvatbildung
durch psychrotrophe Mikroorganismen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Waltraud Arold
aus
Kassel

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. Kräußlich
Referent: Professor Dr. G. Terplan
Korreferent: Professor Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion: 24. Februar 1978



Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Methoden zur Ermittlung der bakteriologischen Wertigkeit von Rohmilch	2
2.2. Einfluß der Lagerung auf die Rohmilchflora	4
2.3. Psychrotrophe Mikroorganismen in Rohmilch	6
2.3.1. Eigenschaften	7
2.3.2. Systematik	9
2.3.3. Bedeutung	10
2.4. Pyruvat als Kriterium der bakteriologischen Beschaffenheit von Milch	11
3. Eigene Untersuchungen	15
3.1. Material und Methoden	15
3.1.1. Beschreibung der Testkulturen	15
3.1.2. Methodik der Versuchsdurchführung	16
3.1.3. Bestimmung von Gesamtkeimzahl und Pyruvatgehalt	18
3.1.4. Ergänzende Untersuchungen zur Pyruvatbildung	18
3.1.4.1. Einfluß des Zusatzes von Pyruvat und L(+)-Laktat	18
3.1.4.2. Beziehungen zwischen Bakterientrockenmasse und Pyruvatbildung	19
3.2. Ergebnisse	19
3.2.1. Untersuchungen zur Pyruvatbildung psychrotropher Mikroorganismen	19
3.2.2. Einfluß des Zusatzes von Pyruvat und L(+)-Laktat	42
3.2.3. Beziehungen zwischen Bakterientrockenmasse und Pyruvatbildung	49
4. Diskussion	53
5. Zusammenfassung/Summary	61
6. Literaturverzeichnis	65

1. EINLEITUNG

Die bakteriologische Beschaffenheit von Rohmilch ist schon seit langem ein wesentliches Kriterium der Qualitätsbewertung. Früher entwickelte und jetzt noch angewandte Methoden zur Erfassung der bakteriologischen Wertigkeit, z.B. die Reduktionsproben, haben sich bei der gegenwärtig stark verbreiteten mechanischen Kühlung der Rohmilch als unzulänglich erwiesen. Für die Einführung der Gesamtkeimzahlbestimmung konnten sich nur wenige Bundesländer entscheiden, zumal diese Methode arbeitsaufwendig und mit erheblichen Kosten verbunden ist.

In den letzten Jahren wurde das automatisierte Verfahren der Bestimmung von Pyruvat als Kriterium bakterieller Aktivität in der Anlieferungsmilch zur Diskussion gestellt. Aufgrund seiner zentralen Stellung im Stoffwechselgeschehen wurde das Pyruvat als ein Maß für die bakteriellen Abbauvorgänge gewertet und damit als ein möglicher Parameter zur Bestimmung der hygienischen Wertigkeit von Rohmilch. Die Untersuchungen zur Zweckmäßigkeit der allgemeinen Einführung der Pyruvatbewertung in die Gütebewertung und hinsichtlich der Eignung für eine gerechte Qualitätsbeurteilung können noch nicht als abgeschlossen betrachtet werden.

Als Beitrag zur Erweiterung der Kenntnisse zu diesem Fragenkomplex soll in der vorliegenden Arbeit das Pyruvatbildungsvermögen von einigen psychrotrophen Keimen in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur geprüft werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Frage, ob die Pyruvatbildung unmittelbar nach der Inokulation der Versuchsmilchen mit psychrotrophen Keimen beginnt oder ob sich zeitliche Verzögerungen ergeben. Weiter sollte geprüft werden, ob die untersuchten Psychrotrophen allgemein zur Pyruvatbildung befähigt sind und wie vorhandenes Pyruvat und auch Laktat utilized werden.

2. LITERATUR

2.1. Methoden zur Ermittlung der bakteriologischen Wertigkeit von Rohmilch

In der Bundesrepublik ist die regelmäßige Ermittlung der bakteriologischen Beschaffenheit der Rohmilch im Rahmen der Güteverordnungen der Länder vorgeschrieben und wird - wie aus Tabelle 1 ersichtlich - regional auf unterschiedliche Weise durchgeführt. Dabei haben die Reduktionsproben noch immer die größte praktische Bedeutung, denn etwa 97% der Milcherzeugung werden zur Zeit mit Hilfe von Methylenblau- bzw. Resazurinprobe bewertet. Nur 3% fallen dagegen auf die Bewertung durch Keimzahlbestimmungsverfahren. Reduktionsproben sind zur Erfassung mikrobieller Substratveränderungen, die mit glykolytischen Prozessen einhergehen, geeignet. Durch Modernisierung der Milcherzeugung unter Einbeziehung von Kühlung bzw. Tiefkühlung der Milch ist die Aussagefähigkeit der Reduktionsproben jedoch stark eingeschränkt, da durch die Kälteeinwirkung die Mikroorganismen in ihrer Aktivität erheblich gehemmt werden. Außerdem erfolgt eine Verschiebung der Florazusammensetzung zugunsten proteolytischer und lipolytischer psychropher Mikroorganismen.

Tabelle 1: Untersuchungsmethoden in den einzelnen Bundesländern zur Feststellung der bakteriologischen Beschaffenheit der Anlieferungsmilch

Methode	Bundesland
Reduktionsprobe (Methylenblau- oder Resazurin- probe)	Baden-Württemberg, Bayern, Bremen, Hessen, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Schleswig-Holstein
Keimzahl- bestimmung	obligatorisch: Berlin, Hamburg, Saarland als Alternativmethode: Bremen, Rheinland-Pfalz

Die Ermittlung der Gesamtkeimzahl in Anlieferungsmilch wird obligatorisch nur im Saarland, in Hamburg und in Berlin durchgeführt. Die Keimzahlbestimmung ist allerdings mit hohen Kosten verbunden. Nach einer in Bremen durchgeführten Berechnung stehen Untersuchungskosten von 20 Pfg. bei Anwendung der Reduktionsprobe denen von 2,85 DM je Probe für die Keimzahlbestimmung gegenüber.

Diese Situation macht die Weiterentwicklung der bestehenden oder die Einführung neuer, preisgünstigerer Meßmethoden notwendig. Den z.T. gebräuchlichen bzw. diskutierten Testverfahren liegen zwei grundsätzlich verschiedene Meßprinzipien zugrunde: Einerseits sind es Zählverfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl, andererseits chemische bzw. enzymatische Verfahren zur Bestimmung von bakteriellen Stoffwechselprodukten.

Als Methoden zur Keimzahlbestimmung kommen vor allem das Ösen-Plattenverfahren nach THOMPSON (1960) in Frage, das von LIMMER und WÖBBECKE (1972) weiter modifiziert wurde, und die elektronische Mikrokoloniezählung nach TOLLE et al. (1968). Trotz des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes bieten indirekte Keimzahlbestimmungen - d.h. die Erfassung koloniebildender Einheiten - große Vorteile, zumal sie auch für Reihenuntersuchungen geeignet sind, wenn sie durch Teilautomatisierungsverfahren, wie z.B. die Computer-Bild-Analyse der Plattenkulturen, technisch verbessert werden (ZAADHOF und TERPLAN, 1971 und 1973). Mit der Mikrokoloniezählung sollen die Möglichkeiten des Koch'schen Plattenverfahrens mit der Präzision und Schnelligkeit des elektronischen Partikelzählverfahrens kombiniert werden.

Für die Ermittlung chemischer und biochemischer Veränderungen werden seit langem Schnelltests bei der Aussortierung stärker veränderter Milch wie Alkoholprobe, Alizarolprobe oder pH-Messung eingesetzt (KYNAST, 1972). Zur Bestimmung der mikrobiologischen Beschaffenheit von Rohmilch erwies sich die Alkoholprobe jedoch als ungeeignet (JORDANS, 1976).

Bakterielle Stoffwechselprodukte wie Ammoniak, freie Fettsäuren (HEESCHEN, 1972 b) bzw. Laktat (HEESCHEN, 1972 a und b; SPRINGMEYER, 1976) können als

Parameter zur Beurteilung der hygienischen Wertigkeit von Milch herangezogen werden. Noch besser geeignet - besonders für tiefgekühlte Milch - scheint jedoch Pyruvat zu sein (HEESCHEN et al., 1972), das erstmals von TOLLE et al. (1972) als sinnvolle und aussagekräftige Meßgröße genannt wurde. Als zentrale Substanz des intermediären Stoffwechsels soll das Pyruvat die Möglichkeit eröffnen, sowohl glykolytische als auch proteo- und lipolytische Stoffwechselaktivitäten der Milchflora zu messen. Damit wäre man in der Lage, Wertminderungen des Substrates Milch durch bakterielle Aktivität während der Lagerung zu erfassen.

Die Messung kann in der kontinuierlichen Durchflußanalyse voll automatisiert werden.

2.2. Einfluß der Lagerung auf die Rohmilchflora

Die Möglichkeiten der mikrobiellen Kontamination der Milch sind vielfältig; Strichkanal, Melkverunreinigungen, Luft, Aufbewahrungsbehälter und Spülwasser stellen bedeutende Infektionsquellen dar (BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, 1969). Die wichtigsten in der Milch vorkommenden Keime sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Milchhygienisch und -technologisch bedeutungsvolle Mikroorganismen in Milch (REUTER, 1973)

grampositive	Stäbchen	Laktobazillen, Mikrobakterien, Propionibakterien, Brevibakterien, Bazillen, Clostridien
	Kokken	Streptokokken Leuconostoc Staphylokokken Mikrokokken
gramnegative Stäbchen		Enterobacteriaceen, Pseudomonaden, Aeromonaden, Achromobacter-Keime, Alcaligenes-Keime, Flavobakterien

Da sich die genannten Keime in ihren Eigenschaften weitgehend unterscheiden, beeinflussen Faktoren wie Lagerungstemperatur und Lagerungszeit die Keimentwicklung auf unterschiedliche Weise. Zum Beispiel bewirkt Milchkühlung eine Verringerung des Bakterienwachstums (BUSSE, 1965), wobei Temperaturen unter 4°C auch bei mehrtägiger Lagerung nur eine geringe Keimvermehrung zulassen (MOURGES et al., 1967; NAKANISHI und TANABE, 1970; DUCHATEAU und LACROSSE, 1973). Nach 48stündiger Lagerung bei 8°C treten bereits mit der Keimzahl in enger Beziehung stehende Geruchs- und Geschmacksabweichungen auf (BECKER, 1964). Für derartige Lagerungszeiten hält LEMKE (1966) eine Temperatur von 2°C für erforderlich, andere Autoren (BECKER, 1964; BUSSE, 1965; BOCKELMANN, 1966; DUCHATEAU und LACROSSE, 1973) halten 4°C für ausreichend, um eine zum Verderb führende Keimentwicklung innerhalb von 48 Stunden zu verhindern. Dabei ist es wichtig, diese Tiefkühltemperaturen so schnell wie möglich zu erreichen, da ein verzögertes Herunterkühlen ebenfalls eine starke Keimzunahme zur Folge hat (THOMAS und THOMAS, 1974).

Weiter muß beachtet werden, daß schon ein leichter Temperaturanstieg eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate, d.h. der Vermehrungsgeschwindigkeit, auslösen kann (BUSSE, 1965; STADHOUDERS, 1975).

Auch die Jahreszeit spielt eine Rolle, denn bei hohen Außentemperaturen im Sommer ist die Kontamination der frisch ermolkenen Milch größer als im Winter (BECKER, 1964; THOMAS und THOMAS, 1974).

Dagegen wirkt sich eine kurzzeitige Temperaturerhöhung durch Zugabe von Frischgemelk zu bereits gekühlter Milch nur unwesentlich aus (BECKER, 1964; BOCKELMANN, 1966; VANCURA, 1972; THOMAS und THOMAS, 1974).

Entsprechend der für bestimmte Keimarten charakteristischen Wachstums- und Temperaturoptima kommt es bei verschiedenen Temperaturbereichen und Lagerungszeiten zur Entwicklung spezifischer Keimzusammensetzungen (BUSSE, 1965; ABO-ELNAGA, 1966).

In frisch ermolkener Milch fand ABO-ELNAGA (1966) Streptokokken oder Mikrobakterien vorherrschend. Außerdem wies er Mikrokokken, *Aerobacter aerogenes* und coliforme Keime nach. Andere Autoren erwähnen auch Staphylokokken und Corynebakterien (BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, 1969; TERPLAN, 1969). Bei niedrigen Temperaturen ($< 7^{\circ}\text{C}$) sind diese Keime jedoch nicht vermehrungsfähig (ABO-ELNAGA, 1966; BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, 1969).

Bleibt die Milch nach dem Melken ungekühlt, wird das Wachstum von Milchsäurebildnern begünstigt, die dann durch Säurebildung hemmend auf die gramnegative Keimflora wirken. Es handelt sich dabei um Streptokokken - vorwiegend *Streptococcus lactis* und *Streptococcus cremoris* - und coliforme Keime (ABO-ELNAGA, 1966). Auch bei 8°C können sich die coliformen Keime noch stark vermehren, während sie bei tieferen Temperaturen deutlich reduziert werden können (BECKER, 1964).

Bei Kühlung der Milch auf Temperaturen von weniger als 10°C bis unter 5°C verschiebt sich die Milchflora zugunsten der psychrotrophen Keime (BOCKELMANN, 1966; ZEILINGER, 1968; KNAUT und MECH, 1972). Allerdings ist der Übergang fließend (BUSSE, 1965).

2.3. Psychrotrophe Mikroorganismen in Rohmilch

Psychrotrophe Keime sind als ubiquitäre Mikroorganismen vor allem in Boden und Wasser zu finden. Sie können aber auch in verschiedenen Futtermitteln wie Gras, Heu, Gerste und Hafer, sowie als saprophytäre Keime an der Euterhaut und an den Zitzen festgestellt werden. Keimreservoir für die Kontamination der Rohmilch sind hauptsächlich das Brauchwasser (KUNDRAT, 1966) sowie insbesondere unsachgemäß gereinigte und entkeimte Melkgerätschaften (THOMAS, 1966; KIELWEIN, 1968; THOMAS und THOMAS, 1974), wobei zu berücksichtigen ist, daß die Wirksamkeit verschiedener chemischer und physikalischer Desinfektionsmittel auf die Keime nur unzureichend ist (KIELWEIN, 1968; KIELWEIN et al., 1969; BECK, 1972; MROZEK, 1975).

2.3.1. Eigenschaften

Psychrotrophe Mikroorganismen sind vorwiegend gramnegative Keime, die sich auszeichnen durch niedrige Maximum- und niedrige Minimum-Temperaturen der Vermehrung sowie die Eigenschaft, sich bei tiefen Temperaturen relativ schnell vermehren zu können (SCHMIDT-LORENZ, 1972). Auf dem Psychrotrophen-Symposium 1976 des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes (IDF) wurde die bereits 1968 festgelegte Definition, Psychrotrophe seien Mikroorganismen, die sich unabhängig vom Temperatur-optimum noch bei Temperaturen unter 7°C vermehren können, wieder übernommen. Daneben werden zahlreiche andere Definitionen diskutiert. So wurde auf dem IDF-Symposium 1975 vorgeschlagen, als Psychrotrophe Keime zu bezeichnen, die sich bei Temperaturen zwischen 2 und 15°C vermehren können und deren Temperaturoptimum bei 10°C liegt. Eine endgültige Einigung konnte auch nach der neuesten Formulierung der Experten im IDF-Gremium nicht erreicht werden.

In dem Milch-Wasser-Gemisch des unsauberen Melkgeschirrs können sich die Keime an Milch adaptieren und dann sofort in frisch ermolkenener Milch weiter vermehren (BUSSE, 1965; TERPLAN, 1969). Auf die zusätzliche Fähigkeit der Adaption an Kälte weisen LOTT (1972) und ZACHARIAH und LISTON (1973) hin.

Eine genaue Kenntnis der Grundmechanismen, die der Kältetoleranz zugrundeliegen, besteht noch nicht. Gemeinsamkeiten dieser Keime sind aber ihre bei niedrigen Temperaturen wirkenden Enzyme und die besondere Struktur ihrer Biomembranen, deren Funktion vom flüssigen Zustand der Lipide abhängt, d.h. von einem höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren (SCHMIDT-LORENZ, 1972).

Bei einer Temperatur von $3,3^{\circ}\text{C}$ wachsen Pseudomonadenstämme z.T. schneller als *Achromobacter*, *Alcaligenes* und *Aerobacter*; Flavobakterien vermehren sich hier gar nicht (MARTH und FRAZIER, 1957). Der Anteil der Pseudomo-

naden am Gesamtgehalt der psychrotrophen Stämme beträgt bei Tiefkühlung ca. 50% (NAKANISHI et al., 1967; NAKAE, 1970). Eine Temperaturabhängigkeit des Pseudomonadenanteils beschreiben NAKANISHI und TANABE (1970), die ihn in tiefgekühlter Milch mit 80 bis 95% angeben, bei etwas höheren Temperaturen dagegen nur noch mit 30 bis 35%, während *Achromobacter* und *Enterobacter* hier günstigere Wachstumsbedingungen finden.

FRANK et al. (1972) kommen zu dem Schluß, daß psychrophile Keime bei niedrigen Temperaturen zwar mit einer Verlangsamung des Wachstums reagieren, sich in ihrer Größe, chemischen Zusammensetzung sowie Katalaseaktivität aber nicht verändern.

Die Mehrzahl der psychrotrophen Bakterienstämme besitzt proteolytische und lipolytische Eigenschaften (LACROSSE, 1966), nach LIMMER (1972) ca. 90% aller Stämme. Bei Untersuchungen von KIURU et al. (1971) erwiesen sich 53% als Proteolyten, hiervon gehörten 84% zu den Pseudomonaden. Während die Pseudomonaden ihres aeroben Wachstums wegen an der Oberfläche wachsen, dringen ihre extrazellulären Enzyme auch in die Tiefe des Substrats (KNAUT, 1967).

Der Enzymwirkungsbereich bezüglich Temperatur ist, wie KRAUS (1960) bei der Untersuchung von Proteolyten feststellen konnte, sehr viel größer als der Wachstumsbereich der Keime, der Enzymbildungsbereich dagegen kleiner.

Die Enzymaktivität kann, besonders nach längerer Lagerung bei etwa 5°C am größten sein (NASHIF und NELSON, 1953). Versuche von MIKAWA und HOSHINO (1973) bestätigten eine Aktivitätsverminderung bei höheren Temperaturen, dagegen beobachteten VAN DER ZANT und MOORE (1955) eine verstärkte Proteolyse mit steigender Temperatur.

Die biochemischen Abbauprozesse als Folge der Enzymaktivität können zu sinnfälligen Veränderungen der Milch führen, die sich beispiels-

weise durch Verminderung des Frischezustands, Harngeruch und unangenehme Aromen bis zum völligen Verderb äußern können (THOMAS und THOMAS, 1974). So wird der als "Futtrigkeit" bezeichnete Geschmacksfehler der Rohmilch durch Pseudomonaden hervorgerufen (KIELWEIN et al., 1969). *Ps. putrefaciens* bewirkt u.a. Geschmacksveränderungen im Rahm (KUNDRAT, 1966).

Besonders nachteilig für die Haltbarkeit der Milch ist die Anwesenheit von *Ps. fluorescens*, *Ps. fragi*, *Ps. aeruginosa* und *Alcaligenes viscolactis*, wobei starke Veränderungen meistens durch gleichzeitiges Auftreten mehrerer Stämme verursacht werden (GYLLENBERG et al., 1963). KIELWEIN et al. (1969) prüften den Einfluß von Kulturüberstand von Pseudomonaden und Aeromonaden auf *Streptococcus lactis* und konnten ein erhöhtes Wachstum der Streptokokken feststellen.

Durch Zugabe eines zellfreien Filtrats von *Ps. fluorescens* zu Lactobazillen wird deren proteolytische Aktivität erhöht (KNAUT et al., 1966). Im allgemeinen ist die psychrotrophe Mikroflora saprophytär. An pathogenen Keimen ist besonders *Ps. aeruginosa* mit einem allerdings nur geringen Wachstum bei niedrigen Temperaturen zu beachten. Als Krankheitserreger kann er bei Mensch und Tier schwere Störungen, wie Durchfallerkrankungen bzw. Eiterungen mit anschließender Sepsis auslösen (KIELWEIN et al., 1968; GRÜN, 1969). Dieser Keim konnte von KIELWEIN et al. (1968) aus 6,7%, von GRÜN (1969) aus 86,2% der untersuchten Rohmilchproben isoliert werden.

2.3.2. Systematik

Die Taxonomie der psychrophilen bzw. psychrotrophen Bakterien stellt ein schwieriges, noch nicht gelöstes Problem dar, da sie aus biologischer Sicht keine einheitliche Gruppe bilden (GYLLENBERG, 1966; REUTER, 1973). Zu den für die Milchwirtschaft wichtigsten Arten von psychrotrophen Mikroorganismen gehören u.a. die Gattungen *Achromobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* und coliforme Bakterien (HEESCHEN et al., 1969). Trotz zahlreicher

Arbeiten über Pseudomonaden als der zahlenmäßig bedeutungsvollsten Gruppe der Psychrotrophen besteht auch noch kein einheitliches System zu deren Klassifizierung. KIELWEIN (1972) hebt unter insgesamt sechs Stoffwechselkriterien den Laktoseabbau als wichtigstes Unterscheidungsmerkmal hervor. BRAATZ (1975) nahm unter Berücksichtigung der Erkenntnisse von STANIER et al. (1966) - Pseudomonaden sind in der Lage, eine große Anzahl organischer Verbindungen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten - eine weitere Einteilung vor, indem er 51 verschiedene Merkmale, die sich größtenteils auf die Verwertung von Kohlenstoffquellen bezogen, austestete und die sich daraus ergebenden 233 Merkmalskombinationen in sechs Gruppen zusammenfaßte.

2.3.3. Bedeutung

Um ein durch verlängerte Lagerungszeiten der Milch im Rahmen der Rationalisierung in der Milchwirtschaft bedingtes zu starkes Bakterienwachstum und damit einen Qualitätsabfall zu verhindern, muß tiefgekühlt werden. Da in niedrigen Temperaturbereichen die Psychrotrophen jedoch verhältnismäßig gute Wachstumsbedingungen finden, besteht die Gefahr einer hohen Keimaktivität, z.B. wenn durch unsachgemäße Behandlung der Geräte der Anfangskeimgehalt und vor allem der Gehalt an aktiv sich vermehrenden Keimen hoch ist. Je größer der Keimbefall, umso tiefer müssen die Kühltemperaturen sein (THOMAS und THOMAS, 1974), obwohl bei sehr starker Keimkontamination auch unter guten Kühlbedingungen eine rasche Keimvermehrung in der Milch nicht verhindert werden kann (THOMAS, 1966).

Da die Kontamination der Milch vorwiegend durch ungenügend gereinigte Geräte erfolgt, kann man aus dem Keimgehalt, d.h. aus Art und Menge der kontaminierenden Keimflora Rückschlüsse auf die angewandte Hygiene bei der Milchgewinnung und bei der weiteren Be- und Verarbeitung ziehen (KIELWEIN et al., 1969). Für die Milchtechnologie von Bedeutung ist die Tatsache, daß sowohl einige Psychrotrophe als auch die Enzyme mancher Arten durch die Erhitzung nicht ausgeschaltet werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß *Bacillus cereus* Süßgerinnung in gekühlter

pasteurisierter Milch verursachen kann (LAWRENCE, 1967), wobei sowohl erhöhte Pasteurisierungstemperaturen als auch ein hoher Pseudomonadenbefall in Rohmilch in Kombination mit Hitzeaktivierung stimulierend auf die Aktivität von *Bacillus cereus* wirken können (OVERCAST und ATMARAM, 1974). Daneben können proteolytische und lipolytische Enzyme, die durch die Pasteurisierung nicht inaktiviert werden, während die Keime abgetötet werden, Qualitätsfehler in Milch und Milchprodukten verursachen (KIELWEIN et al., 1969).

Größenordnungen von Zahlen psychrotropher Keime, die zu organoleptischen Veränderungen führen, variieren in Abhängigkeit von der Art der Keime. ZOLLIKOFER (1973) fordert einen möglichst geringen Keimgehalt für Anlieferungsmilch, damit die Gefahr, die Risikogrenzen bis zur weiteren Verarbeitung zu erreichen bzw. zu überschreiten, ausgeschaltet wird. THOMAS und THOMAS (1974) halten einen Grenzwert von 10^4 Keimen/ml für Anlieferungsmilch für erforderlich.

Aufgrund der starken enzymatischen Aktivität der Psychrotrophen gerade unter Kühlbedingungen wurde von TOLLE et al. (1972) erstmals vorgeschlagen, die Stoffwechselaktivität der in gekühlter Rohmilch vorhandenen Mikroorganismen anhand des zentralen Stoffwechselfparameters Pyruvat zu messen. Damit soll eine Möglichkeit geschaffen werden, die Ungenauigkeiten der Gesamtkeimzahlbestimmung nach KOCH (LEMBKE und WASSERFALL, 1963) oder ähnlicher Verfahren durch einen objektiven Qualitätsmaßstab zu ersetzen.

2.4. Pyruvat als Kriterium der bakteriologischen Beschaffenheit von Milch

Pyruvat, das Salz der Brenztraubensäure, wird von TOLLE (1973 a) als Schlüsselsubstanz aller mikrobiologischen Stoffwechselvorgänge betrachtet.

Der Abbau der Kohlenhydrate, der je nach Bakterienart über drei verschiedene Stoffwechselwege - a) Fructose-1,6-diphosphat (FDP-Weg), b) Pentose-

Phosphat (PP-Weg), c) 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconsäure (KDPG-Weg) - verläuft (WOOD, 1961; SCHLEGEL, 1974), steht ebenso wie der Eiweiß- und Fettabbau mit dem Pyruvatsammelbecken in Verbindung (TOLLE et al., 1972; TOLLE, 1973 a).

Da nach einer Modellvorstellung von TOLLE et al. (1972) die Bakterienzellen - als offenes System - durch die Zellwände mit dem Substrat Milch in Verbindung stehen, kann das in der Zelle gebildete Pyruvat aufgrund eines ständig bestehenden Fließgleichgewichts u.a. auch aus den Bakterien in die Milch austreten, wo es quantitativ erfaßbar ist. In der Milch befindet es sich in Lösung und ist dementsprechend gleichmäßig verteilt. Dadurch wird die Probenahme - im Gegensatz zur Probenahme für die Gesamtkeimzahlbestimmung - wesentlich erleichtert. Die Pyruvatanalytik bietet mit hoher Präzision und hoher Probenfrequenz eine wirtschaftliche Möglichkeit zur Erfassung der bakteriologischen Beschaffenheit von Milch.

Die zunächst schwierige Frage der Konservierung von Milchproben für die Pyruvatanalytik soll inzwischen hinreichend gelöst sein, so daß mit Trichloressigsäure oder Perchlorsäure ein Zeitraum von mehreren Tagen ohne Veränderung des Pyruvatgehaltes überbrückt werden könne (HEESCHEN et al., 1977).

In zahlreichen Veröffentlichungen (TOLLE et al., 1972; TOLLE, 1973 a, b, c, und 1974; HEESCHEN et al., 1972 und 1974; HEESCHEN, 1975; SUHREN et al., 1975; STAHLHUT-KLIPP und KRONENBERGER, 1975) wird von weiteren Vorzügen des Pyruvats berichtet: Da das Pyruvat die Pasteurisation unverändert überstehe, könne auch in der Trinkmilch ein sich kontinuierlich addierendes Bild der hygienischen Wertigkeit des Produktes von der Gewinnung bis zum Konsum durch den Pyruvatgehalt ermittelt werden. Eine einmalige Pyruvatmessung liefere eine Information über den augenblicklichen bakteriologischen Status der Trinkmilch; durch eine zweite Messung nach Inkubation läßt sich der Pyruvatdifferenzwert bestimmen, der in der Tendenz eine Voraussage über das mikrobiell bedingte Verderbnisrisiko, d.h. die Haltbarkeit von Trinkmilch, ermöglicht.

Der Anstieg des Pyruvatgehaltes der Milch über einen als "sekretorischen Basiswert" oder "background" bezeichneten physiologischen Grenzwert von 0,5 ppm sei ausschließlich auf bakterielle Stoffwechselvorgänge zurückzuführen. Da die bakterielle Aktivität, die einer Pyruvatgehaltserhöhung in der Milch zugrunde liegt, nicht nur von der Zahl, sondern auch von der Art der Keime abhängt, müsse bei Vergleichen zwischen Pyruvatgehalt und Keimzahl einer Milch beachtet werden, daß es sich um zwei einander nicht vollkommen entsprechende Größen handle (HEESCHEN et al., 1974).

Trotzdem wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen Pyruvat und Gesamtkeimzahl in Sammelmilchproben festgestellt, der sich mit abnehmender Lagerungstemperatur vergrößerte (TOLLE et al., 1972). HEESCHEN et al. (1972) ermittelten einen Korrelationskoeffizienten von $r = +0,89$ bei einer Lagerungstemperatur von 6°C ; bei 9°C betrug er nur noch $r = +0,68$.

Nach STAHLHUT-KLIPP (1974) und WIESNER (1975) nimmt bei Tiefkühltemperaturen unter 5°C der Pyruvatgehalt schon nach einigen Stunden zu, während der Keimgehalt fast gleich bleibt.

In bei 5°C gelagerten Rohmilchproben stellten ELBERTZHAGEN und MENNINGER (1977) einen verzögerten Pyruvatanstieg fest, der erst nach zwei bis drei Tagen deutlich einsetzte; der Keimgehalt dagegen vergrößerte sich sofort mit maximaler Vermehrungsgeschwindigkeit. Je geringer der Anfangskeimgehalt war, umso langsamer und schwächer erfolgte die Pyruvatzunahme. In Keimzahlbereichen unter 10^6 Keimen/ml wurde überhaupt kein Pyruvatanstieg gemessen. Auch BRUNS (1976) fand einen in unteren Keimzahlbereichen abnehmenden Korrelationskoeffizienten zwischen Pyruvat und Keimzahl. Für den Bereich von unter 10^6 Keimen/ml (dem ein Pyruvatwert von ca. 1,5 ppm entspricht) empfiehlt er Koloniezählverfahren, da hier die Pyruvatmessung keine differenzierten Ergebnisse liefere. Dagegen sehen HEESCHEN et al. (1974) in der Methode der Pyruvatbestimmung gerade für Bereiche mit noch geringer mikrobieller Belastung eine genaue Differenzierungsmöglichkeit.

SPRINGMEYER et al. (1976) untersuchten den Einfluß der Lagerungszeit auf die Pyruvat-Keimzahlbeziehung. Sie stellten fest, daß in frischer Rohmilch kein Zusammenhang zwischen diesen Parametern bestehe. Bei Tieftemperaturen wird die Korrelation erst nach sechs Stunden - bei höheren Temperaturen früher - erkennbar. Die Autoren schließen daraus, daß die Pyruvatmethode grundsätzlich nur bei ein- und zweitägiger Milchablieferung, nicht dagegen bei zweimal täglicher zur Bewertung der hygienischen Qualität der Milch geeignet sei. Sie weisen außerdem darauf hin, daß statistisch gesicherte Beziehungen zwischen Pyruvat und Keimzahl nur eine allgemeine Tendenz angeben, für den Einzelfall aber keine Aussagekraft besitzen müssen. Dies wird u.a. auch in Arbeiten von HEESCHEN (1972 a), WERNERY (1972) und SUHREN (1973) deutlich, die sich - als Grundlagen für die Eignung der Pyruvatmethode zur Qualitätsbestimmung von Rohmilch - mit dem Pyruvatbildungsvermögen verschiedener Reinkulturen von psychrotrophen Bakterienstämmen befaßten. Es wurden Untersuchungen bei einer Lagerungstemperatur von 6 und 9°C über vier bis sechs Tage durchgeführt, wobei die Messungen nach jeweils 24 Stunden stattfanden. Es zeigte sich, daß besonders innerhalb der ersten 24 Stunden zwischen Pyruvat- und Keimzahlzunahme oft kein deutlicher Zusammenhang bestand. Während in den meisten Fällen von Anfang an eine starke Keimentwicklung zu erkennen war, nahmen die Pyruvatwerte - besonders bei 6°C - nur wenig zu. In Einzelfällen gingen bei starker Keimzunahme in einem Zeitraum von 24 Stunden die Pyruvatwerte sogar zurück. Die Phase der stärksten Pyruvatentwicklung setzte immer erst nach 24 Stunden oder später ein (wobei sich die genauen Zeitpunkte - aufgrund der 24stündigen Untersuchungsintervalle - den Darstellungen nicht entnehmen lassen).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Beschreibung der Testkulturen

Den bei den eigenen Versuchen verwendeten Psychrotrophen lag die jüngste Definition der IDF-Experten (1976) zugrunde (siehe auch Kapitel 2.3.1.), daß Psychrotrophe Keime seien, die sich unabhängig vom Temperaturoptimum noch bei Temperaturen unter 7°C vermehren können.

Für die Untersuchungen standen zwölf Reinkulturen von Laborstämmen psychrotropher Bakterien zur Verfügung. Davon waren acht Pseudomonadenstämme: *Pseudomonas fragi* (P₁ und P₂), *Pseudomonas spec.* (P₃), *Pseudomonas putida* (P₄, P₅ und P₆), *Pseudomonas fluorescens* (P₇ und P₈). Die restlichen vier waren Achromobacterstämme: A₁, A₂, A₃, A₄. Außerdem wurden sieben Pseudomonadenstämme untersucht, die aus Rohmilch isoliert worden waren: P₉, P₁₀, P₁₁, P₁₂, P₁₃, P₁₄ und P₁₅. Zur Isolation dieser Stämme wurde der von KIELWEIN (1971 b) empfohlene GSP-Agar (= Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar) mit keimhaltiger Rohmilch beimpft und nach 48stündiger Bebrütung bei 30°C die rot-blau gewachsenen Kolonien zur Reinzüchtung erneut auf GSP-Agar überimpft. Anschließend wurde der Cytochromoxydase-Test durchgeführt und sieben cytochromoxydasepositive Stämme ausgewählt.

Die Bebrütung aller genannten Teststämmen erfolgte in hitzebehandelter Milch, wobei in fünf Versuchsgruppen (Tabelle 3: Versuchsgruppen 1, 3, 4, 6 und 7) die Erhitzung von roher Milch für jeweils 30 Minuten auf 100°C im Dampftopf an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt wurde; bei zwei Versuchsreihen (Tabelle 3: Versuchsgruppen 2 und 5) wurde Rohmilch einmalig für zehn Minuten auf 80°C erhitzt. Die Vorbereitung der Teststämmen für die Versuche wurde folgendermaßen vorgenommen:

Von Schrägagarkulturen wurden die Stämme zunächst in sterile Nährbouillon überimpft (Nutrient-Broth, Oxoid) und 16 Stunden bei 30°C angezüchtet,

dann zur Adaptation an Milch mit einer Platinöse (0,02 ml Inhalt) in 10 ml H-Milch überimpft und neun Stunden bei 20°C bebrütet. Anschließend wurde jeweils 1 ml in 1 Liter hitzebehandelter Milch überimpft.

3.1.2. Methodik der Versuchsdurchführung

Die so beimpften Milchproben (jeweils 1 Liter in einem 2-Liter-Erlenmeyerkolben) wurden kontinuierlich auf ihren Pyruvat- und Keimgehalt geprüft, nachdem sie bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen bebrütet worden waren.

Für orientierende Untersuchungen wurde bei 7 und 15°C ein relativ langer Zeitraum von 120 Stunden gewählt, bei 20°C dagegen nur ein solcher von 31 Stunden. Für die in der Praxis der Milcherzeugung üblichen Lagerungstemperaturen von ca. 3, 6 und 12°C wurden 48-Stunden-Versuche durchgeführt mit unterschiedlichen, z.T. sehr kurzen Probenahmeintervallen. Dabei sollte die Pyruvatbildung der Psychrotrophen möglichst lückenlos in dem Zeitraum beobachtet werden, der für bakterielle Stoffwechselaktivität während ein- bis zweitägiger Lagerung der Rohmilch im landwirtschaftlichen Betrieb in Betracht kommt.

Aus Tabelle 3 geht hervor, welche Stämme bei welcher Temperatur geprüft wurden, zu welchen Zeitpunkten Proben entnommen wurden und nach welcher Zeit die Versuche abgeschlossen wurden.

Im einzelnen wurden folgende Versuche durchgeführt:

Zwölf Laborstämme (P_1 bis P_6 und A_1 bis A_4) wurden bei 7 und 15°C in Milch bebrütet und in Zeitabständen von 24 Stunden bis einschließlich 120 Stunden nach Inokulation untersucht (Tab. 3: Versuchsgruppen 3 und 6).

Vier Laborstämme (P_6 , P_7 , A_3 , A_4) wurden bei 3 und bei 12°C in Milch bebrütet und in Zeitabständen von zwei bzw. vier Stunden bis einschließlich 48 Stunden nach Inokulation untersucht (Tab. 3: Versuchsgruppen 1 und 4).

Tabelle 3: Versuchsanordnung (Temperaturen, Dauer und Probeentnahmezeitpunkte) bei der Untersuchung verschiedener psychrotropher Bakterien auf Pyruvatbildungsvermögen

Versuchsgruppe	Temperatur (°C)	Stamm	Versuchsdauer (Std.)	Probeentnahmezeitpunkte
1	3	P ₆ , P ₇ A ₃ , A ₄	48	von 0 bis 24 Std.: alle 4 Std. von 24 bis 48 Std.: alle 2 Std.
2	6	P ₆ P ₉ - P ₁₅	48	nach 0, 24, 36, 42, 48 Std.
3	7	P ₁ - P ₈ A ₁ - A ₄	120	nach jeweils 24 Std.
4	12	P ₆ , P ₇ A ₃ , A ₄	48	von 0 bis 24 Std.: alle 2 Std. von 24 bis 48 Std.: alle 4 Std.
5	12	P ₉ - P ₁₅ P ₆	48	nach 0, 12, 15, 18, 21, 36, 48 Std.
6	15	P ₁ - P ₈	120	nach jeweils 24 Std.
7	20	A ₁ - A ₄	31	von 0 bis 7 Std.: stündlich von 23 bis 31 Std.: stündlich

Zwölf Laborstämme (P_1 bis P_8 und A_1 bis A_4) wurden bei 20°C in Milch bebrütet und in Zeitabständen von jeweils einer Stunde von 0 bis 7 Stunden sowie von 23 bis 31 Stunden nach Inokulation untersucht (Tab. 3: Versuchsgruppe 7).

Sieben aus Rohmilch isolierte Pseudomonadenstämme (P_9 bis P_{15}) und ein Laborstamm als Kontrolle (P_6) wurden bei 12 und 6°C in Milch bebrütet und in unterschiedlichen Zeitabständen bis einschließlich 48 Stunden nach Inokulation untersucht (Tab. 3: Versuchsgruppen 2 und 5).

3.1.3. Bestimmung von Gesamtkeimzahl und Pyruvatgehalt

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde während der Versuchsdurchführung unmittelbar nach jeder Probeentnahme im Plattengußverfahren nach KOCH entsprechend den Empfehlungen des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes, IDF (1958), durchgeführt.

Die Bestimmung des Pyruvatgehaltes erfolgte im Auto-Analyzer-II-System der Firma Technicon nach STAHLHUT-KLIPP (1975 a und b). Die Analyse beruht auf dem Prinzip, daß Pyruvat bei Anwesenheit des Enzyms LDH (Laktatdehydrogenase) bei gleichzeitiger Oxidation des Coenzyms $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ zu Laktat reduziert wird. Die verbrauchte Menge an $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ ist der Pyruvatmenge äquivalent und wird fotometrisch bestimmt.

3.1.4. Ergänzende Untersuchungen zur Pyruvatbildung

3.1.4.1. Einfluß des Zusatzes von Pyruvat und $\text{L}(+)$ -Laktat

Die Stämme $P_1 - P_8$ und $A_1 - A_4$ wurden in hitzebehandelter Milch, der 15 mg/Liter Pyruvat bzw. 100 mg/Liter $\text{L}(+)$ -Laktat zugesetzt worden waren, bei 30°C inkubiert. Die Untersuchung auf Pyruvat, $\text{L}(+)$ -Laktat sowie Gesamtkeimzahl erfolgte nach 24 und 48 Stunden Bebrütung. Zum Vergleich wurde die Untersuchung der Kulturen auch in Milch ohne Zusatz durchgeführt.

3.1.4.2. Beziehungen zwischen Bakterientrockenmasse und Pyruvatbildung

Die Stämme P_1 , P_4 , P_6 , P_7 , P_8 und $A_1 - A_4$ wurden in jeweils 100 ml steriler Nährbouillon (Nutrient Broth, Oxoid) bei 30°C bebrütet und nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Inkubation auf Bakterientrockenmasse, Gesamtkeimzahl und Pyruvat untersucht. Die Bakterientrockenmasse wurde in Anlehnung an die Angaben von MALETTE (1969) bestimmt: Jeweils 10 ml der Bouillonkulturen wurden in Reagenzgläsern, deren Leergewicht mittels Analysenwaage bestimmt worden war, 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes und dreimaligem Waschen des Rückstandes mit jeweils 10 ml Aqua dest. bei 100°C im Trockenschrank 1 1/2 bis 2 Stunden (bis zur Gewichtskonstanz) getrocknet und bis zur Auskühlung im Exsikkator aufbewahrt. Das Gewicht der die Bakterientrockenmasse enthaltenden Reagenzgläser wurde erneut in der Analysenwaage bestimmt. Vom Differenzwert (Reagenzglas plus Bakterientrockenmasse minus Leergewicht) wurde das Gewicht des ebenfalls nach Zentrifugieren und Trocknen erhaltenen Rückstandes der un-beimpften Nährbouillon subtrahiert, woraus sich die Bakterientrockenmasse in Gramm je 10 ml ergab.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Untersuchungen zur Pyruvatbildung psychrotropher Mikroorganismen

In den ersten Versuchsreihen wurden die Stämme $P_1 - P_8$ und $A_1 - A_4$ zunächst bei 7 bzw. 15°C über insgesamt 120 Stunden inkubiert (Tab. 3, Versuchsgruppe 3 und 6). In den Tabellen 4 bis 7 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt. Danach ließ sich hinsichtlich des Pyruvatgehaltes feststellen, daß dieser bis zur zweiten Auswertung nach 48 Stunden Lagerung bei 7°C stets zugenommen (Tabelle 4), später aber (nach 72, 96 oder 120 Stunden) mit Ausnahme der Stämme P_6 und A_4 wieder abgenommen hatte. Dieser Rückgang war bei drei Proben (P_4 , P_5 , A_1) so beträchtlich, daß bei Versuchsende kein Pyruvat mehr nachgewiesen werden

konnte. Bei der Lagerung bei 15°C (Tabelle 6) waren die Verhältnisse ähnlich, wenn davon abgesehen wird, daß sich bei P_4 bereits nach 48 Stunden Pyruvatabnahme ergab, bei A_4 kein Rückgang registriert wurde und die Schlußuntersuchung auf Pyruvat bei P_4 , P_6 und P_7 negativ verlief. Besonders deutlich wird die nach längeren Beobachtungszeiträumen eintretende Pyruvatabnahme aus den Tabelle 8 und 9, in denen die jeweiligen Differenzen zwischen zwei Beobachtungen angegeben wurden. Dabei wurden die Stämme entsprechend ihrer Pyruvatbildungsaktivität nach 24 Stunden geordnet.

Die Keimzahlen (Tabelle 5 und 7) stiegen zwar bei allen Stämmen auch nur bis zu 48 Stunden Lagerung zumeist stärker bei 15°C als bei 7°C , doch war auch später noch bei mehreren Proben Keimzahlzunahme gegeben. In keinem Falle war die Keimzahl bei Versuchsende jedoch niedriger als bei Versuchsbeginn.

Der Vergleich von Anfangskeimzahlen und Pyruvatgehalt nach 24, 48, 72, 96 oder 120 Stunden führt zu folgenden Beobachtungen: Anfangskeimzahlen zwischen 50×10^3 und $1,5 \times 10^6$ (Tabelle 5) bewirkten demnach bei 7°C innerhalb der ersten 24 Stunden 0,5 bis 4,9 ppm Pyruvatzunahme und in der Zeit von 24 bis 48 Stunden noch weitere 0,7 bis 7,5 ppm (Tabelle 8). Hieraus resultierten Gesamtwerte von 2,0 – 8,9 ppm. Dabei zeigten sechs Stämme innerhalb der ersten 24 Stunden, die anderen sechs Stämme innerhalb der folgenden 24 Stunden stärkere Pyruvatbildung. Nach 72 Stunden war, wie bereits erwähnt, bei einigen Stämmen schon ein rückläufiges Verhalten beim Pyruvatgehalt nachweisbar. Bei 15°C führte das Wachstum der Stämme $P_1 - P_8$ und $A_1 - A_4$ mit Anfangskeimzahlen von 50×10^3 bis $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ nach 24 Stunden zu Pyruvatbildungen von 0,1 – 9,2 ppm (Tabelle 9). Nach 48 Stunden waren, abgesehen von der genannten Ausnahme P_4 , weitere 0,3 bis 6,4 ppm Pyruvat gebildet worden. Dies ergab Gesamtzunahmen an Pyruvat von 0,6 – 14,3 ppm. Nach 72 Stunden wurde bereits bei insgesamt sechs Stämmen Pyruvatgehaltsminderung (–0,2 bis –4,4 ppm) ermittelt. Bei gemeinsamer Verrechnung der zum gleichen Beobachtungszeitpunkt erhaltenen

Pyruvatwerte für die getesteten zwölf Stämme zeigte sich, daß bei 7°C im Mittel im Zeitabschnitt 0 bis 24 Stunden weniger Pyruvat gebildet wurde als im Intervall 24 bis 48 Stunden (Tabelle 10). Bei 15°C war die Pyruvatzunahme dagegen in der Zeit von 0 bis 24 Stunden am stärksten und dabei noch höher als die in der maximalen Phase bei 7°C. Bei beiden Temperaturen sank die Pyruvatbildungsaktivität im Zeitraum von 48 bis 72 Stunden auf einen minimalen Wert, um danach (72 bis 120 Stunden) in eine Pyruvatabbauphase überzugehen.

Tabelle 4: Pyruvatgehalt der mit den Stämmen P₁ - P₈ bzw. A₁ - A₄ inokulierten Milchproben nach Lagerung bei 7°C

Stamm	Pyruvatgehalt (ppm) nach Lagerung in Stunden					
	0	24	48	72	96	120
P ₁	0,2	2,0	4,7	5,8	7,2	5,2
P ₂	0,5	3,9	6,5	6,5	3,7	0,6
P ₃	0,6	4,4	9,3	9,3	7,8	3,9
P ₄	0,5	1,0	3,7	3,7	2,5	0,0
P ₅	0,6	4,5	6,4	3,6	0,0	0,0
P ₆	0,9	2,3	9,8	13,0	15,2	15,4
P ₇	0,7	4,4	8,6	8,4	8,4	6,8
P ₈	1,1	2,2	8,0	n.a.	7,2	4,0
A ₁	0,5	5,1	n.a.	5,5	3,0	0,0
A ₂	0,6	5,5	9,0	8,0	5,3	1,2
A ₃	0,6	2,0	2,7	2,7	8,0	0,1
A ₄	0,4	4,3	9,1	12,6	15,2	15,4

n.a. = nicht ausgeführt

Tabelle 5: Keimgehalt der mit den Stämmen $P_1 - P_8$ bzw. $A_1 - A_4$ inokulierten Milchproben nach Lagerung bei 7°C

Stamm	Keimzahl (in $10^6/\text{ml}$) nach Lagerung in Stunden					
	0	24	48	72	96	120
P_1	0,07	0,3	0,5	5	8	8
P_2	0,2	3	19	47	30	56
P_3	0,05	0,2	11	27	54	50
P_4	0,2	3	13	19	26	30
P_5	0,2	3	27	42	57	66
P_6	0,6	3	54	34	33	35
P_7	0,6	2	26	58	4	5
P_8	0,3	1	10,5	37	7	5
A_1	1,0	7,5	22	44	34	37
A_2	1,5	5	13	40	23	23
A_3	1	6	36	43	27	26
A_4	0,2	13	63	48	24	23

Tabelle 6: Pyruvatgehalt der mit den Stämmen P₁ - P₈ bzw. A₁ - A₄ inokulierten Milchproben nach Lagerung bei 15°C

Stamm	Pyruvatgehalt (ppm) nach Lagerung in Stunden					
	0	24	48	72	96	120
P ₁	0,2	3,9	5,0	6,1	6,0	3,5
P ₂	0,5	5,1	9,0	8,0	5,0	2,1
P ₃	0,6	5,1	9,6	8,6	8,2	5,5
P ₄	0,5	9,7	9,2	4,8	0,5	0,0
P ₅	0,6	6,0	6,8	5,5	2,5	0,8
P ₆	0,9	6,0	11,0	10,8	3,0	0,0
P ₇	0,7	2,7	3,0	3,6	2,0	0,0
P ₈	1,1	9,0	15,4	n.a.	n.a.	n.a.
A ₁	0,5	6,0	7,8	6,5	2,9	0,9
A ₂	0,6	6,0	11,8	12,7	10,5	4,2
A ₃	0,6	1,7	6,0	7,3	5,0	0,6
A ₄	0,4	0,5	1,0	9,1	17,0	18

n.a. = nicht ausgeführt

Tabelle 7: Keimgehalt der mit den Stämmen $P_1 - P_8$ bzw. $A_1 - A_4$ inokulierten Milchproben nach Lagerung bei 15°C

Stamm	Keimzahl (in $10^6/\text{ml}$) nach Lagerung in Stunden					
	0	24	48	72	96	120
P_1	0,07	2	45	22	71	57
P_2	0,2	13	41	110	300	640
P_3	0,05	0,5	52	255	490	590
P_4	0,2	3,5	33	95	89	71
P_5	0,2	0,5	108	370	560	1050
P_6	0,6	11	244	230	35	35
P_7	0,6	22	560	49	42	33
P_8	0,3	0,4	2	n.a.	n.a.	n.a.
A_1	1,0	10	51	156	160	236
A_2	1,5	7	38	58	420	254
A_3	1	2	31	104	167	194
A_4	0,2	0,2	25	37	93	87

n.a. = nicht ausgeführt

Tabelle 8: Beeinflussung des Pyruvatgehaltes durch die Stämme $P_1 - P_8$
bzw. $A_1 - A_4$ bei 7°C

Stamm	Anstieg (bzw. Abfall) des Pyruvatgehaltes (ppm) zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten				
	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.	120 Std.
P_4	0,5	2,7	0	-1,2	-2,5
A_3	1,4	0,7	0	5,3	7,9
P_6	1,4	7,5	3,2	2,2	0,2
P_1	1,8	2,7	1,1	1,4	2,0
P_8	1,1	5,8	n.a.	-0,8	-3,2
P_5	3,9	1,9	-2,8	-3,6	0
P_7	3,7	4,2	-0,2	0	-1,6
P_2	3,4	2,6	0	-2,8	-3,1
A_4	3,9	4,8	3,7	2,6	0,2
A_1	4,6	0,9	-0,4	-2,5	-3,0
P_3	3,8	4,9	0	-1,5	-3,9
A_2	4,9	3,5	-1,0	-2,7	-4,1

Tabelle 9: Beeinflussung des Pyruvatgehaltes durch die Stämme $P_1 - P_8$
bzw. $A_1 - A_4$ bei 15°C

Stamm	Anstieg (bzw. Abfall) des Pyruvatgehaltes (ppm) zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten				
	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.	120 Std.
A_4	0,1	0,5	8,1	7,9	1
A_3	1,1	4,3	1,3	-2,3	-4,4
P_7	2,0	0,3	0,6	-1,6	-2,0
P_1	3,7	1,1	1,1	-0,1	-2,5
P_3	4,5	4,5	-1,0	-0,4	-2,7
P_2	4,6	3,9	-1,0	-3,0	-2,9
P_6	5,1	5,0	-0,2	-7,8	-3,0
P_5	5,4	0,8	-1,3	-3,0	-1,7
A_2	5,4	5,8	0,9	-2,2	-6,3
A_1	5,5	1,7	-1,2	-3,6	-2,0
P_8	7,9	6,4	n.a.	n.a.	n.a.
P_4	9,2	-0,5	-4,4	-4,3	-0,5

n.a. = nicht ausgeführt

Tabelle 10: Durchschnittliche Pyruvatzunahme von zwölf in Milch inokulierten Psychrotrophenstämmen bei 7 bzw. 15°C innerhalb einzelner Zeitabschnitte

Temperatur (°C)	Mittlere Pyruvatzunahme (ppm) in den Zeitabschnitten		
	0 - 24 Std.	24 - 48 Std.	48 - 72 Std.
7	2,9	3,5	0,25
15	4,5	2,8	0,3

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Stämme P₆, P₇, A₃ bzw. A₄ bei Lagerungstemperaturen von 3 bzw. 12°C auf ihr Pyruvatbildungsvermögen in hitzebehandelter Milch getestet. Dabei wurden die Versuche auf insgesamt 48 Stunden begrenzt und alle zwei bzw. vier Stunden Proben entnommen (Tab. 3, Versuchsgruppe 1 bzw. 4). Die dabei erzielten Daten sind in den Abbildungen 1 und 2 (Pyruvat) bzw. 3 und 4 (Keimzahl) wiedergegeben.

Die Anfangskeimzahlen lagen bei allen vier Stämmen bei ca. 10⁴ Keimen /ml und stiegen bei der Lagerung bei 3°C langsam an, aber nur bei P₆ um mindestens eine Zehnerpotenz. Auch die Pyruvatwerte veränderten sich bei dieser Temperatur nur unwesentlich. In keinem Fall nahmen die Ausgangswerte (0,7 - 1,0 ppm) so erheblich zu, daß im Laufe der Versuche Pyruvatgehalte über 2 ppm nachzuweisen waren. Es ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich, eindeutig zu entscheiden, ob es sich bei den Veränderungen immer um echte Zu- bzw. Abnahmen (insbesondere nach 48 Stunden) handelt. Die Pyruvatentwicklung derselben vier Stämme bei 12°C zeigt einen bei den einzelnen Stämmen unterschiedlich stark ausgeprägten mehrphasigen Verlauf: Unmittelbar nach Versuchsbeginn bis ca. 14 bis 18 Stunden Lagerungszeit war der Pyruvatanstieg mit ca. 1 ppm sehr gering. Nach dieser relativ wenig aktiven Anfangs-

phase trat starke Pyruvatbildung ein. Dabei wurden mit Ausnahme von P_6 Konzentrationen von über 10 ppm erreicht. Bei den beiden Stämmen (P_7 und A_3), bei denen diese zweite Phase nach 32 bzw. 36 Stunden Lagerung beendet war, blieb die erreichte Pyruvatkonzentration bis zum Versuchsende (48 Stunden Lagerung) fast unverändert erhalten, während bei den beiden anderen Stämmen ein weiterer Pyruvatanstieg zu registrieren war. Die Vermehrung der Keime war bei 12°C erwartungsgemäß wesentlich stärker als bei 3°C . Nach zehn Stunden waren in jedem Fall 10^5 Keime/ml, nach 28 bis 34 Stunden mehr als 10^7 Keime/ml vorhanden.

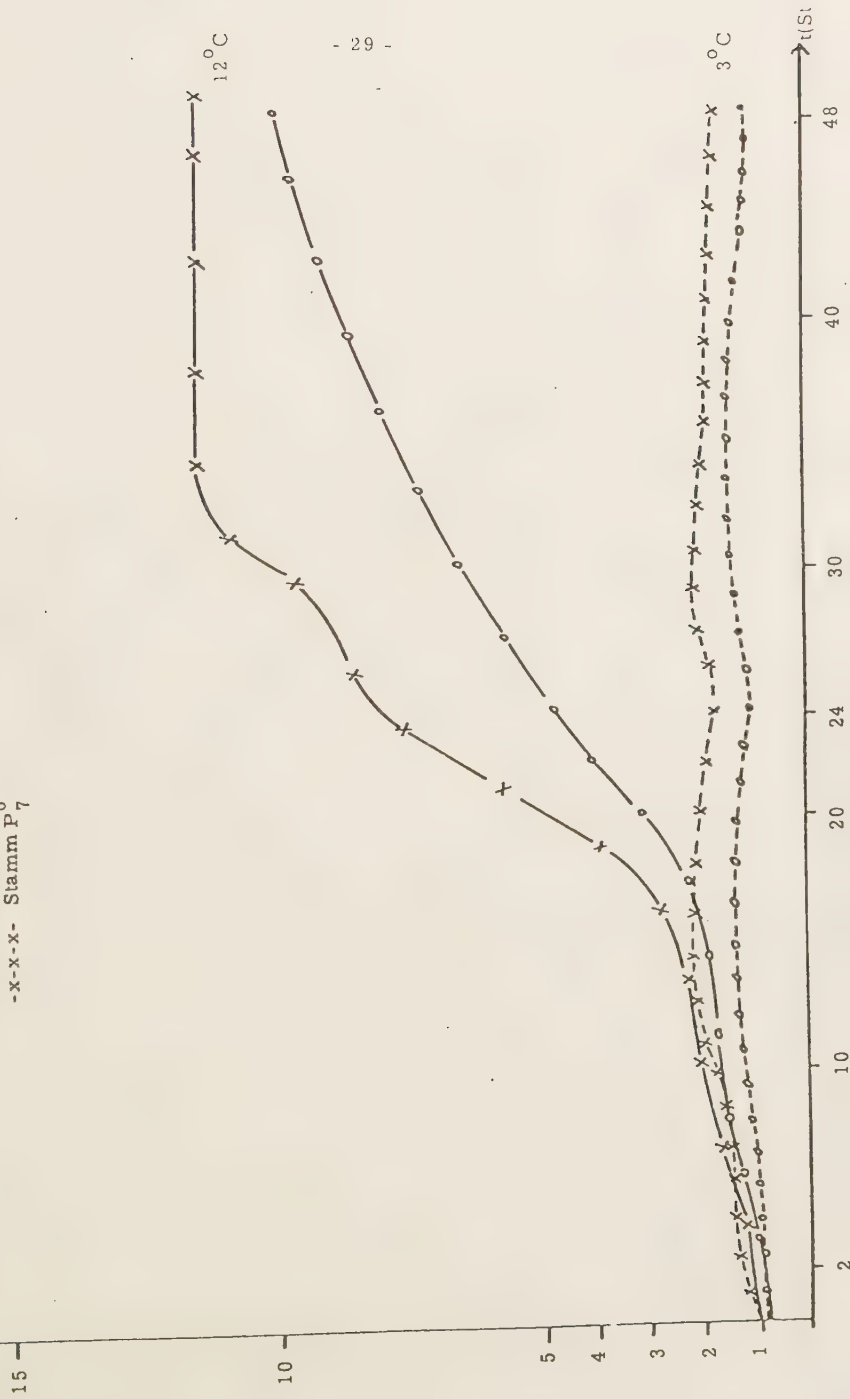
Auch bei Lagerungstemperaturen von 20°C (Tabelle 3, Versuchsgruppe 7) war die Mehrphasigkeit der Pyruvatbildung zu beobachten. In der Abbildung 5 sind die Ergebnisse mit dem Stamm P_4 beispielhaft für die untersuchten Stämme $P_1 - P_8$ und $A_1 - A_4$ dargestellt. In einer Anfangsphase von drei Stunden nach der Inokulation wurden nur 0,7 ppm Pyruvat freigesetzt, während in den nächsten vier Stunden der Pyruvatgehalt der Milch auf fast 10 ppm anstieg. Nach 23 Stunden Versuchsdauer – in der Zwischenzeit fand keine Untersuchung statt – war der Pyruvatgehalt mit 12 ppm noch etwas höher. Bis zum Ende dieses Versuchs (31 Stunden Lagerungszeit) kam es dann zu einem kontinuierlichen Pyruvatabbau von fast 1 ppm je Stunde. (Diese Phase der Pyruvatminderung konnte allerdings nicht bei allen Stämmen erfaßt werden, da die Beobachtungen bereits nach 31 Stunden abgeschlossen wurden.) Die Keimzahlen stiegen dabei von $30 \times 10^3/\text{ml}$ auf $200 \times 10^3/\text{ml}$ nach sechs Stunden an. Nach 25 bzw. 31 Stunden wurden 6×10^6 bzw. 31×10^6 Keime/ml festgestellt.

Die Stämme P_1, P_2, P_3, P_5, P_8 und A_4 zeigten ebenfalls zu Anfang der Lagerung eine Phase mit geringer Pyruvatbildung (< 1 ppm), die sich über einen Zeitraum von zwei (A_4) bis sechs Stunden (P_8) erstreckte. Bei den Stämmen P_6 und P_7 sowie $A_1 - A_3$ stieg der Pyruvatgehalt innerhalb der ersten Stunde bereits um 1 bis 2 ppm. Nach 23 Stunden hatten die Pyruvatkonzentrationen um 10 bis 17 ppm zugenommen und stiegen bis Versuchsende nach 31 Stunden zum Teil noch geringfügig (um 1 bis 3 ppm) weiter an, zum Teil wurde Pyruvat bereits auch wieder abgebaut.

Pyruvat
(ppm)

Abbildung 1: Entwicklung des Pyruvatgehaltes der
Milch während der Inkubation mit
P₆ und P₇

-o-o-o- Stamm P₆
-x-x-x- Stamm P₇



Milch während der Inkubation mit

A_3 und A_4

-o-o-o- Stamm A_3

-x-x-x- Stamm A_4

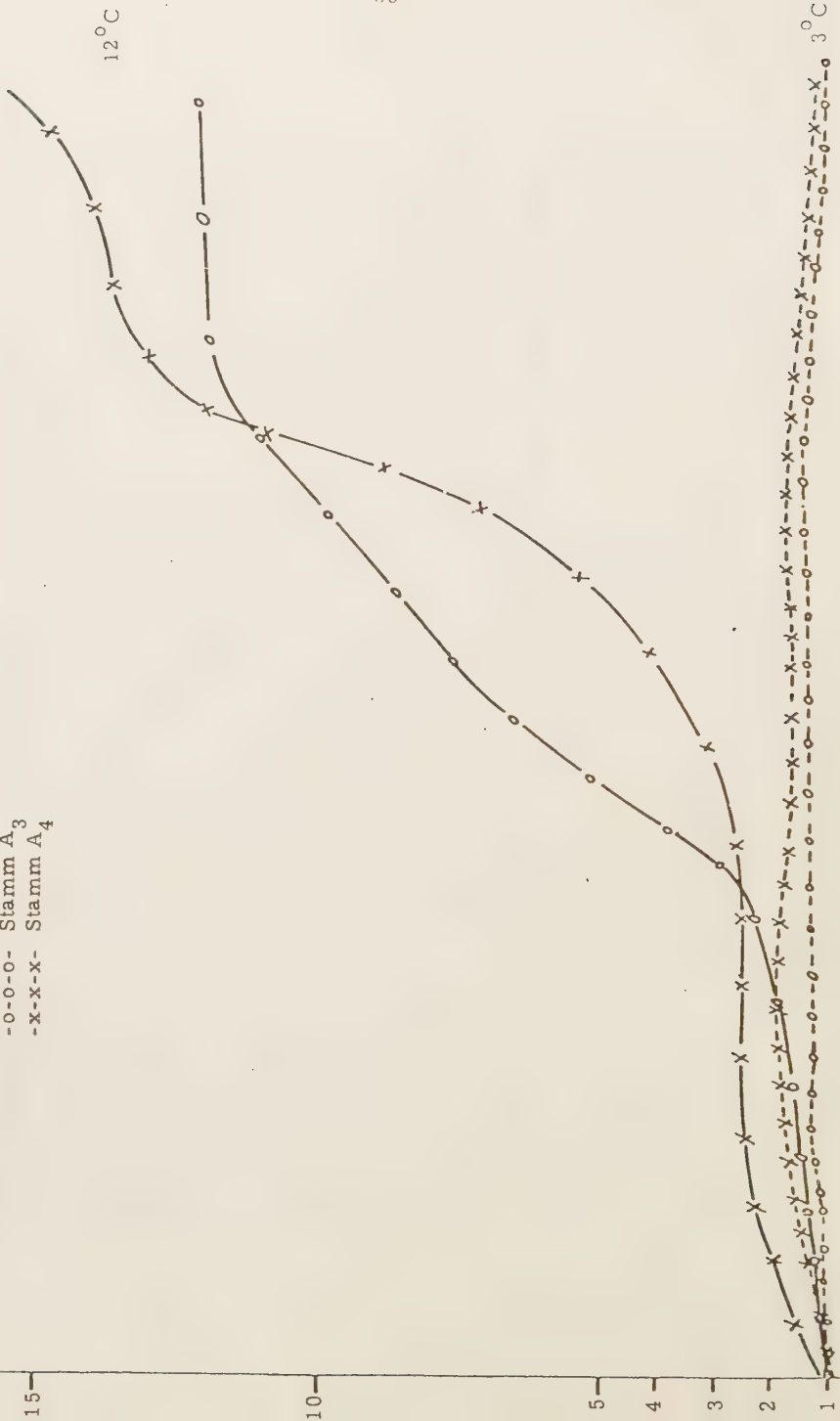
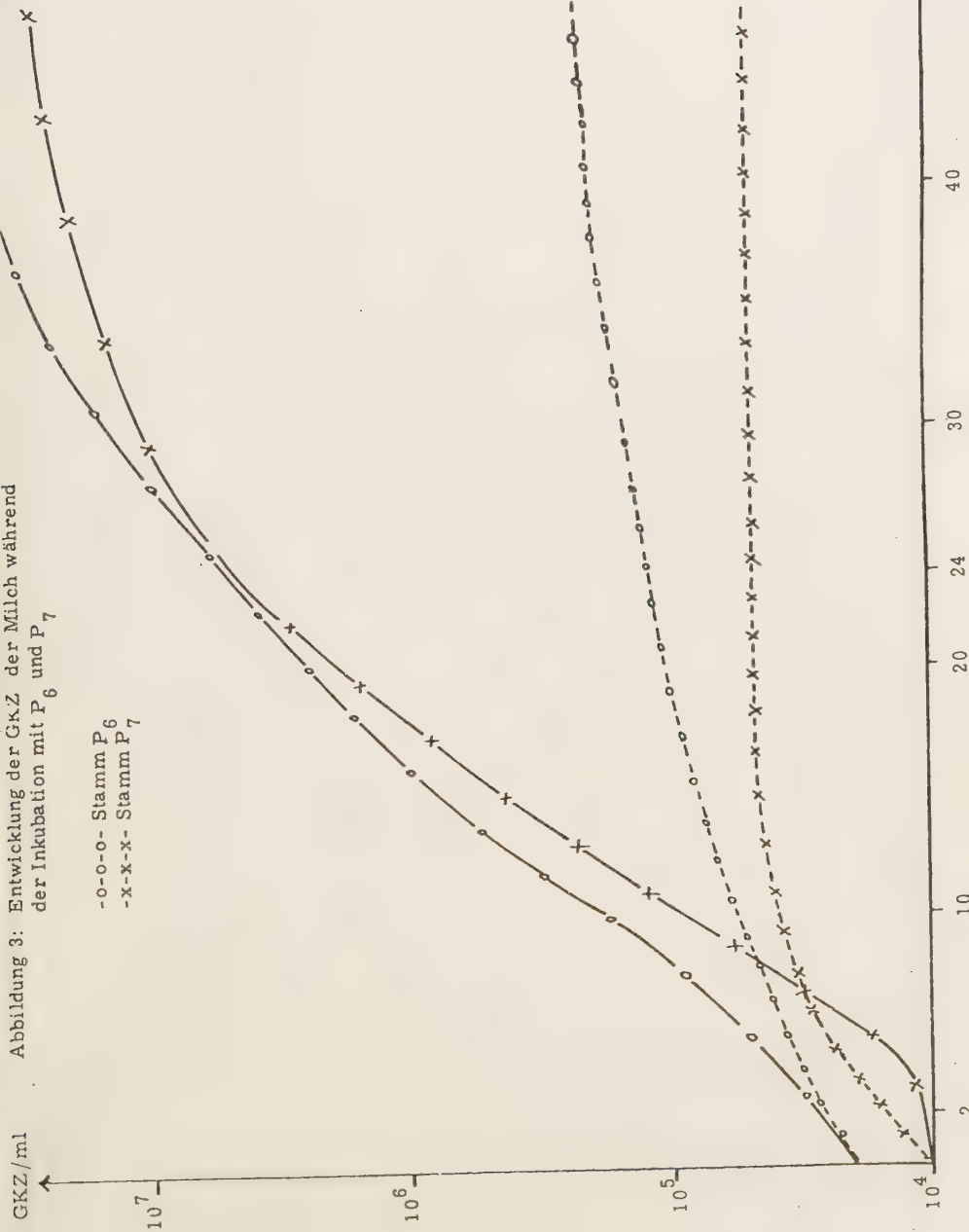


Abbildung 3: Entwicklung der GKZ der Milch während der Inkubation mit P₆ und P₇



GKZ./ml

Abbildung 4: Entwicklung der GKZ der Milch während der Inkubation mit A₃ und A₄

-o-o-o- Stamm A₃
-x-x-x- Stamm A₄

10⁷

10⁶

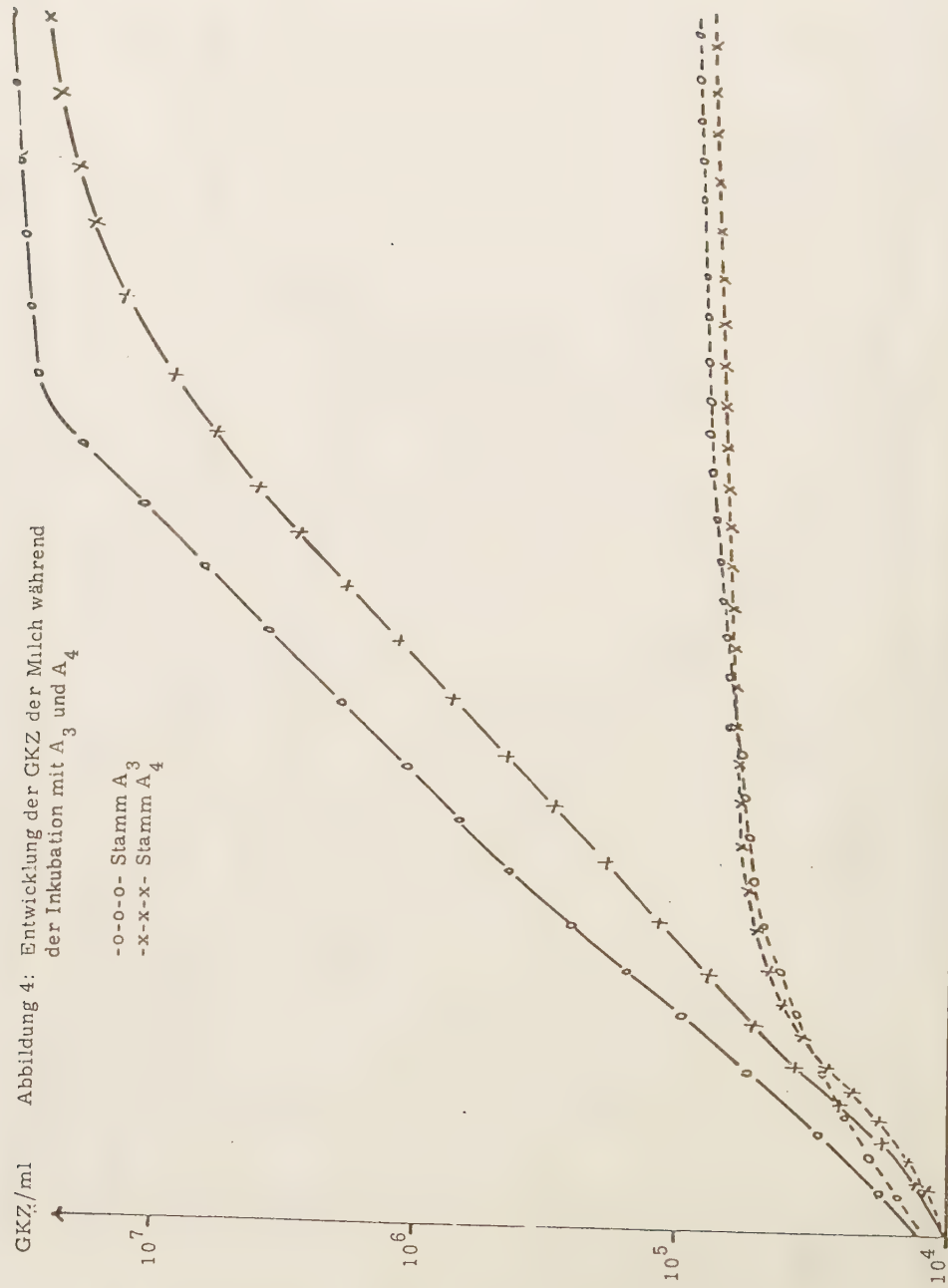
10⁵

10⁴

12° C

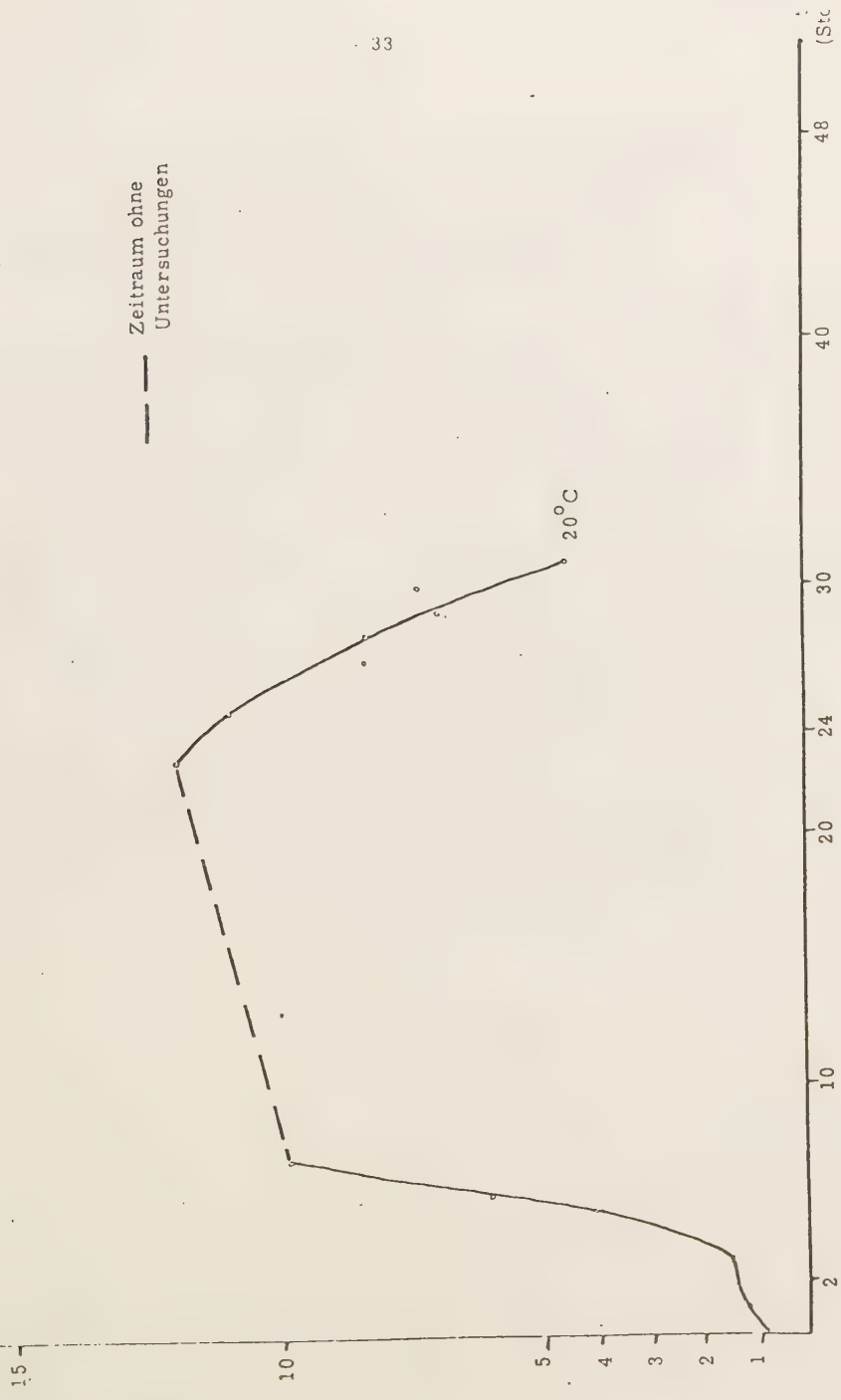
- 32 -

3° C



Pyruvat
(ppm)

Abbildung 5: Entwicklung des Pyruvatgehaltes der Milch
während der Inkubation mit P_4 über
31 Stunden bei 20°C



Die Ergebnisse der Untersuchung der sieben aus Rohmilch isolierten psychrotrophen Stämme $P_9 - P_{15}$ bei 6°C und 12°C für 48 Stunden (Tab. 3, Versuchsgruppe 2 und 5) sind in den folgenden Tabellen 11 - 14 sowie in den Abbildungen 6 - 8 dargestellt. Zum Vergleich wurde hier der Stamm P_6 (aus der Sammlung) mitgetestet. Bei Anfangskeimzahlen von 1 bis $15 \times 10^3/\text{ml}$ wurden nach 48 Stunden bei 6°C zwischen 2×10^5 und 11×10^6 und bei 12°C zwischen $7,5 \times 10^6$ und $1,2 \times 10^8$ Keime/ml festgestellt. Die Pyruvatbildung verlief bei einer Temperatur von 12°C ähnlich wie schon für die vorhergehende Versuchsreihe beschrieben wurde. Bei 12°C begann im allgemeinen erst nach einer weniger aktiven Anfangsphase von ca. 18 bis 21 Stunden eine stärkere Pyruvatfreisetzung. Allerdings war bei Stamm P_9 während des gesamten Versuchs keine eindeutige Pyruvatzunahme gegeben. Bei 6°C konnte bei zwei Stämmen (P_{10} , P_{15}) erstmals zwischen 24- und 36stündiger Lagerung eine deutliche Pyruvatzunahme beobachtet werden, bei einem weiteren Stamm (P_{12}) nach mindestens 36 Stunden Lagerung. Während bei P_{11} und P_{13} zwischen 42 und 48 Stunden noch ein signifikanter Anstieg (0,3 - 0,4 ppm) zu registrieren war, wurden bei den anderen Stämmen (einschließlich des Kontrollstamms P_6) bis Versuchsende nur unbedeutende Schwankungen festgestellt (Zu- bzw. sogar Abnahme bei P_9). (Die Keimzahlen der entsprechenden Stämme waren im gleichen Zeitraum um eine bis zwei Zehnerpotenzen gestiegen.)

Tabelle 11: Pyruvatgehalt der mit den Stämmen P₆ bzw.

P₉ - P₁₅ inokulierten Milchproben nach Lagerung
bei 6°C

Stamm	Pyruvatgehalt (ppm) nach Lagerung in Stunden				
	0	24	36	42	48
P ₉	1,1	1,0	0,9	0,8	0,8
P ₁₀	1,1	1,1	1,9	3,2	5,4
P ₁₁	1,2	1,1	1,0	1,4	1,7
P ₁₂	1,3	1,2	1,4	2,4	4,4
P ₁₃	1,2	1,1	1,1	1,4	1,8
P ₁₄	1,0	1,1	1,1	1,3	1,3
P ₁₅	1,0	1,3	2,8	4,9	7,3
P ₆	1,0	0,9	1,1	1,2	1,2
(Kon- trolle)					

Tabelle 12: Keimgehalt der mit den Stämmen P₆ bzw. P₉-P₁₅
inokulierten Milchproben nach Lagerung bei
6°C

Stamm	Keimzahlen (in 10 ³ /ml) nach einer Inkubationszeit von Stunden				
	0	24	36	42	48
P ₉	13	9	66	n.a.	215
P ₁₀	10	n.a.	77	175	800
P ₁₁	2	n.a.	33	93	193
P ₁₂	4	n.a.	90	179	739
P ₁₃	4	8	308	728	1573
P ₁₄	1	13	125	n.a.	336
P ₁₅	15	114	784	2394	11344
P ₆ (Kontrolle)	3,0	19	77	144	272

n.a. = nicht ausgeführt

Tabelle 13: Pyruvatgehalt der mit den Stämmen P₆ bzw. P₉ - P₁₅
inokulierten Milchproben nach Lagerung bei 12°C

Stamm	Pyruvatgehalt (ppm) nach Lagerung in Stunden						
	0	12	15	18	21	36	48
P ₉	1,1	1,3	1,1	1,1	1,2	1,0	1,3
P ₁₀	1,1	1,4	1,8	2,8	4,7	8,4	9,1
P ₁₁	1,2	1,3	1,2	1,4	1,6	6,3	7,2
P ₁₂	1,3	1,4	1,5	1,8	2,7	7,8	8,6
P ₁₃	1,2	1,2	1,3	1,3	1,4	4,3	5,8
P ₁₄	1,0	1,1	1,1	1,0	1,0	2,3	3,1
P ₁₅	1,0	1,3	1,7	2,3	3,7	8,3	9,3
P ₆	1,0	1,3	1,3	1,3	1,3	1,9	4,0
(Kontrolle)							

Tabelle 14: Keimgehalt der mit den Stämmen P₆ bzw. P₉ - P₁₅
inokulierten Milchproben nach Lagerung bei 12°C

Stamm	Keimzahlen (in 10 ³ /ml) nach einer Inkubationszeit von Stunden						
	0	12	15	18	21	36	48
P ₉	13	29	53	n.a.	103	1603	10903
P ₁₀	10	n.a.	90	n.a.	n.a.	1920	21870
P ₁₁	2	n.a.	11	n.a.	35	885	7835
P ₁₂	4	40	n.a.	n.a.	82	1652	44152
P ₁₃	4	24	45	103	n.a.	1613	7463
P ₁₄	1	4,5	14	n.a.	n.a.	1654	28504
P ₁₅	15	n.a.	236	n.a.	2476	24476	123976
P ₆ (Kontrolle)	3	n.a.	53	171	375	7775	31075

n.a. = nicht ausgeführt

Pyruvat
(ppm)

Abbildung 6: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch, während
der Inkubation mit P₁₀ und P₁₅

-o-o-o- Stamm P₁₀

-x-x-x- Stamm P₁₅



Pyruvat
(ppm)

Abbildung 7: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch während
der Inkubation mit P₁₁ und P₁₂

-o-o-o-o- Stamm P₁₁

-x-x-x-x- Stamm P₁₂

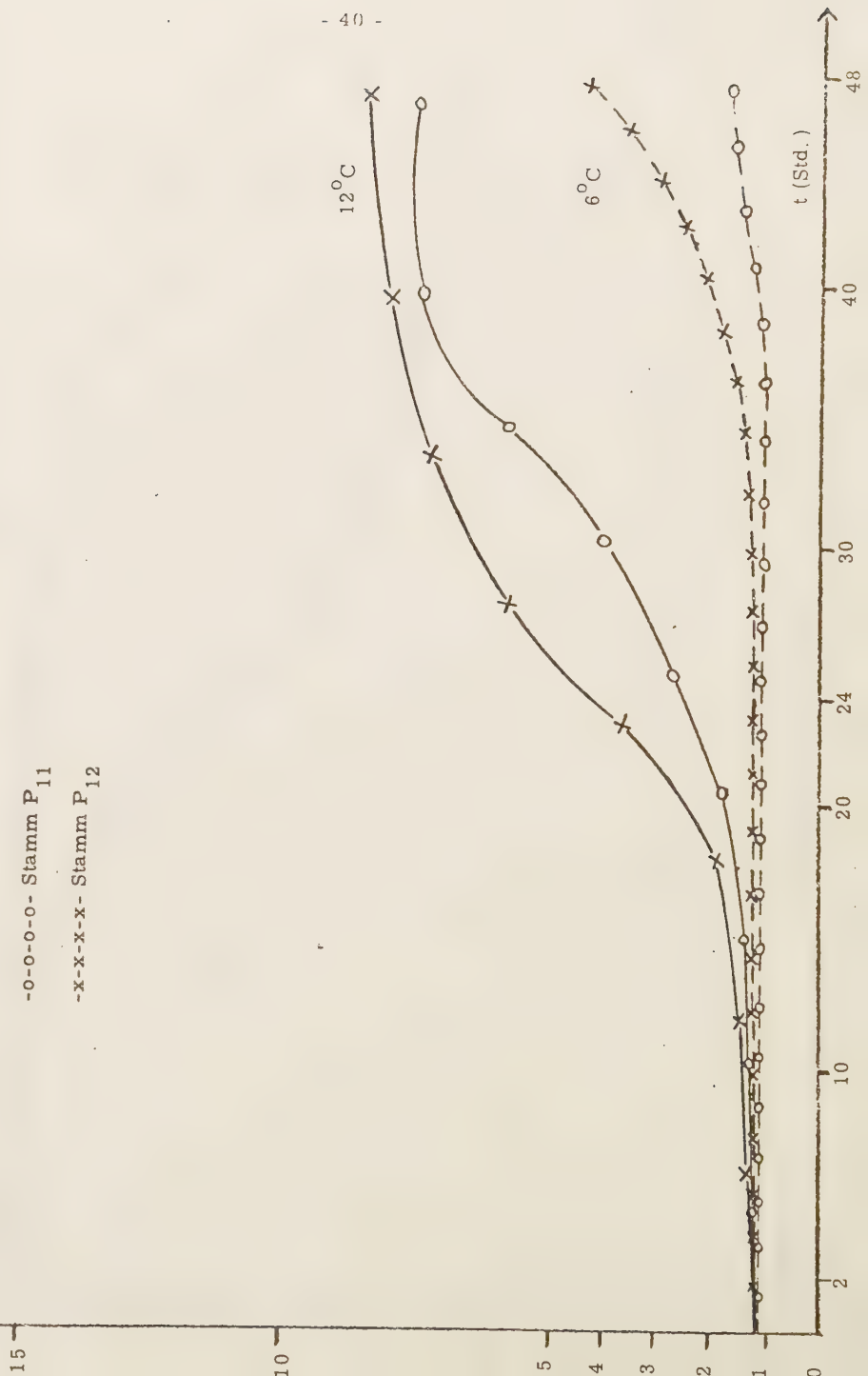
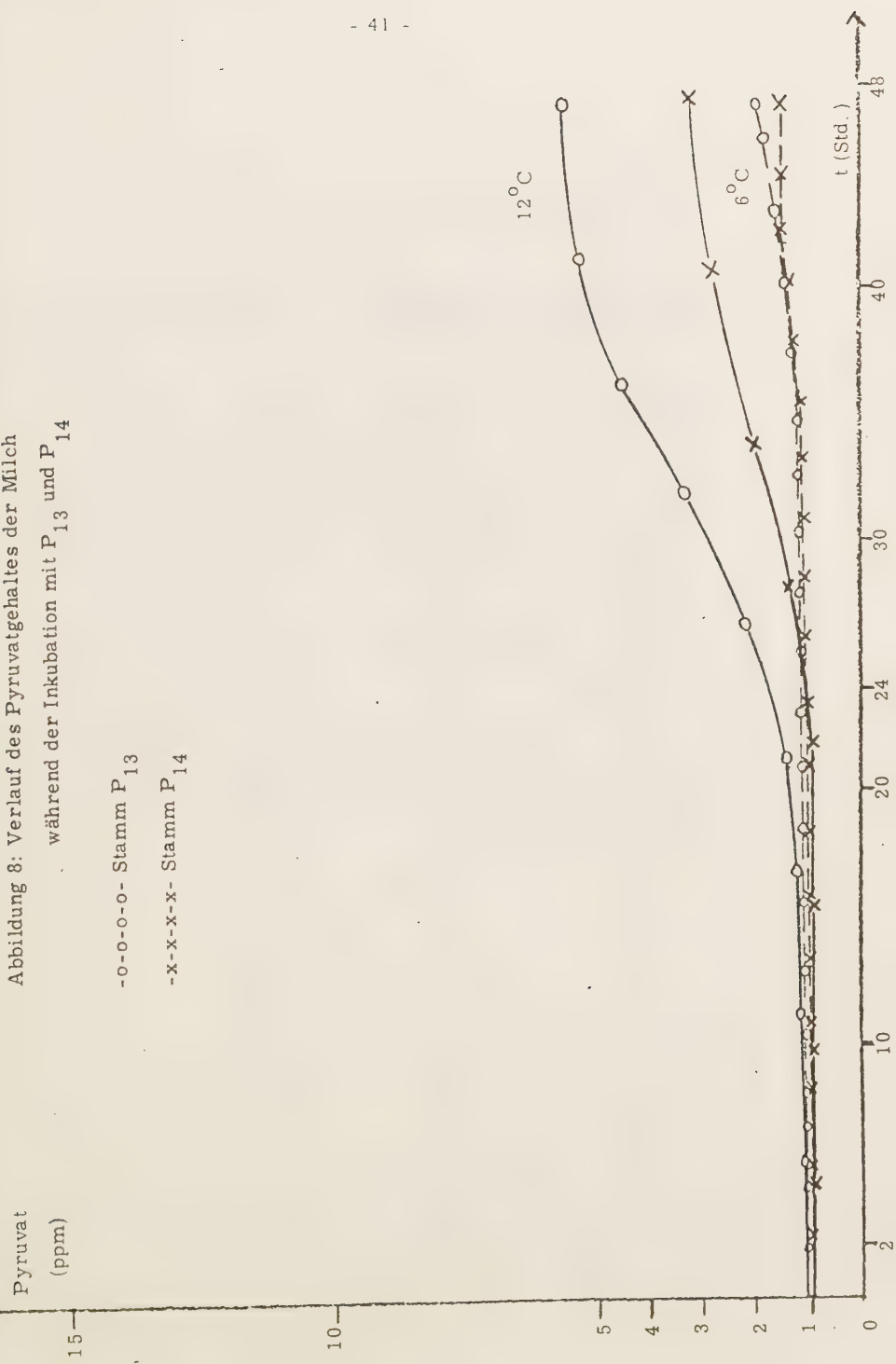


Abbildung 8: Verlauf des Pyruvatgehaltes der Milch
während der Inkubation mit P_{13} und P_{14}

-o-o-o-o- Stamm P_{13}

-x-x-x-x- Stamm P_{14}



3.2.2. Einfluß des Zusatzes von Pyruvat und L(+)-Laktat

In Tabelle 15 sind die Pyruvatwerte der mit 15 mg/Liter Pyruvat versetzten Proben zusammengefaßt. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Werte der entsprechenden Proben ohne Pyruvatzusatz an.

Zum Zeitpunkt der Inokulation lag der Pyruvatgehalt der zwölf Milchchargen, denen Pyruvat zugesetzt worden war, zwischen 15 und 16 ppm. Die Milch ohne Pyruvatzusatz enthielt zwischen 0,2 und 0,6 ppm. Nach 24 Stunden stiegen bei sechs Stämmen (P_1 , P_8 , A_1 , A_2 , A_3 , A_4) die Pyruvatkonzentrationen auf ca. 25 ppm, bei einem Stamm (P_7) auf 17,5 ppm; demgegenüber stiegen die Konzentrationen derselben Stämme in Milchproben ohne Pyruvatzusatz auf ca. 8 bis 10 ppm (P_1 , P_8 , A_1 , A_2 , A_3 , A_4) bzw. auf 6,3 ppm (P_7). Bei den restlichen fünf Ansätzen ($P_2 - P_6$), die den Pyruvatzusatz enthielten, war nach 24 Stunden eine Pyruvatabnahme zu beobachten: Bei den Stämmen P_2 , P_4 , P_5 , P_6 auf Werte zwischen 11,2 und 13,5 ppm, bei P_3 auf 2,6 ppm. Ohne Pyruvatzusatz stieg bei denselben fünf Stämmen der Pyruvatgehalt auf Werte zwischen 4,0 und 5,7 ppm. Nach 48 Stunden war bei allen untersuchten Proben, mit oder ohne Pyruvatzusatz, der Pyruvatgehalt auf Werte zwischen 0,1 und 4,2 ppm gesunken.

Tabelle 15: Pyruvatgehalt der mit den Stämmen P₁ - P₈ bzw. A₁ - A₄ inokulierten Milchproben mit und ohne Pyruvatzusatz nach 0, 24 und 48 Stunden Lagerung bei 30°C

Stamm	Pyruvatgehalt (ppm)* nach unterschiedlicher Lagerung		
	0 Stunden	24 Stunden	48 Stunden
P ₁	15,8 (0,4)	25,0 (10,0)	0,1 (3,9)
P ₂	15,7 (0,4)	11,2 (4,5)	1,8 (1,6)
P ₃	15,6 (0,3)	2,6 (4,0)	1,8 (1,2)
P ₄	15,9 (0,4)	13,0 (4,3)	3,1 (0,2)
P ₅	15,5 (0,2)	11,7 (4,9)	4,2 (0,4)
P ₆	15,4 (0,5)	13,5 (5,7)	0,8 (0,4)
P ₇	15,7 (0,4)	17,5 (6,3)	1,0 (0,5)
P ₈	15,6 (0,2)	24,0 (8,8)	2,1 (3,8)
A ₁	15,7 (0,4)	26,0 (10,0)	2,0 (2,8)
A ₂	15,8 (0,2)	25,6 (9,8)	1,6 (2,2)
A ₃	15,5 (0,4)	24,8 (7,9)	1,5 (0,3)
A ₄	15,6 (0,6)	25,9 (8,0)	2,3 (2,5)

* Die Werte der Proben ohne Pyruvatzusatz sind in Klammern gesetzt.

Tabelle 16 zeigt den Pyruvatanstieg bzw. -abfall der zwölf geprüften Kulturen nach 24 bzw. 48 Stunden Bebrütung. In sechs Versuchsansätzen stieg nach 24 Stunden demnach in den Milchproben mit Pyruvatzusatz der Pyruvatgehalt ebenso stark an wie in Milchproben ohne Zusatz ($P_1, P_8, A_1 - A_4$). Im Versuchsansatz mit dem Stamm P_7 wurde zwar der Pyruvatgehalt in der pyruvatangereicherten Milch nach 24 Stunden noch erhöht, jedoch mit ca. 2 ppm nur ein Drittel so stark wie in der Milch ohne Pyruvatzusatz. Die restlichen Stämme ($P_2 - P_6$) bewirkten während der ersten 24 Stunden einen Abbau des Pyruvates, das der Milch zugesetzt war, während in der Milch ohne Pyruvatzusatz diese Stämme die Pyruvatkonzentrationen um ca. 4 ppm erhöhten. Nach 48 Stunden Lagerung war in der Milch, die mit Pyruvat angereichert war, wesentlich mehr Pyruvat (bis fast 25 ppm) abgebaut worden als in Milch ohne Pyruvatzusatz (bis zu 7,6 ppm).

Tabelle 16: Beeinflussung des Pyruvatgehaltes durch die Stämme
 $P_1 - P_8$ bzw. $A_1 - A_4$ in Milchproben mit und ohne
 Pyruvatzusatz (Lagerung bei 30°C)

Stamm	Anstieg (bzw. Abfall) des Pyruvatgehaltes *) in ppm nach Inkubationszeiten von	
	24 Stunden	48 Stunden
P_1	9,2 (9,6)	-24,9 (3,9)
P_2	-4,5 (4,1)	-9,4 (-2,9)
P_3	-13,0 (3,7)	-0,8 (-2,8)
P_4	-2,9 (3,9)	-9,9 (-4,1)
P_5	-3,8 (4,7)	-7,5 (-4,5)
P_6	-1,9 (5,2)	-12,7 (-5,3)
P_7	1,8 (5,9)	-16,5 (-5,8)
P_8	8,4 (8,6)	-21,9 (-5,0)
A_1	10,3 (9,6)	-24,0 (-7,2)
A_2	9,8 (9,6)	-24,0 (-7,6)
A_3	9,3 (7,5)	-23,3 (-7,6)
A_4	10,3 (7,4)	-23,6 (-5,5)

*) Die Werte der Proben ohne Pyruvatzusatz sind in Klammern gesetzt.

Bei den Versuchen mit $P_2 - P_8$ wurden parallel zu den Pyruvatmessungen Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Die Anfangskeimzahlen lagen im Bereich von 10^3 bis $1,5 \times 10^5$ Keimen/ml. Nach 48 Stunden hatten sie um 4 bis 6 Zehnerpotenzen zugenommen, wobei zwischen den Proben mit und ohne Pyruvatzusatz nur unwesentliche Unterschiede entstanden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Keimgehalt der mit den Stämmen $P_2 - P_8$ inokulierten Milchproben mit und ohne Pyruvatzusatz

Stamm	Keimzahl (in $10^6/\text{ml}$) ^{*)} nach Inkubation bei 30°C für		
	0 Stunden ^{**)}	24 Stunden	48 Stunden
P_2	0,02	23 (20)	1450 (1700)
P_3	0,001	243 (227)	1130 (1200)
P_4	0,02	217 (221)	1110 (1190)
P_5	0,03	166 (161)	970 (1040)
P_6	0,01	171 (183)	660 (740)
P_7	0,15	297 (286)	840 (1080)
P_8	0,002	6 (8)	262 (250)

*) Die Werte der Proben ohne Pyruvatzusatz sind in Klammern gesetzt.

**) Gilt für Ansätze mit und ohne Pyruvatzusatz.

Der Zusatz von 100 mg/Liter L(+)-Laktat führte von Pyruvatanfangsgehalten von 0,2 bis 0,6 ppm zu Werten von 7,2 bis 14,4 ppm nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden war bei zwei Stämmen eine weitere Zunahme um 1 bzw. 3 ppm eingetreten; bei den restlichen Stämmen konnte dagegen eine Pyruvatabnahme auf Werte zwischen 0,6 und 10 ppm ermittelt werden. (Die Vergleichswerte der Pyruvatmessung für die Milchproben ohne Zusatz gehen aus Tabelle 15 hervor.) Die entsprechenden Werte der L(+)-Laktatbestimmung lagen zum Zeitpunkt der Inokulation zwischen 156 und 166 ppm (bei den Proben ohne Zusatz von L(+)-Laktat bei ca. 60 ppm). Im Verlauf der Lagerung nahm der L(+)-Laktatgehalt ab; nach 24 Stunden enthielten die Proben zwischen 95 und 150 ppm und nach 48 Stunden zwischen 23 und 89 ppm L(+)-Laktat (Tabelle 18).

Tabelle 18: Pyruvat-, L(+)-Laktat- und Keimgehalt der mit den Stämmen P₁ - P₈ bzw. A₁ - A₄ inokulierten Milchproben mit Zusatz von 100 ppm L(+)-Laktat nach Lagerung bei 30°C

Stamm	bei Inokulation		nach 24 Stunden		nach 48 Stunden	
	Pyruvat (ppm)	Laktat (ppm)* GKZ/ml x 10 ⁶	Pyruvat (ppm)	Laktat (ppm)* GKZ/ml x 10 ⁶	Pyruvat (ppm)	Laktat (ppm)* GKZ/ml x 10 ⁶
P ₁	0,4	157 (60)	12,0	116 (58)	15,0	59 (15)
P ₄	0,4	156 (56)	10,7	95 (30)	8,3	32 (4)
P ₅	0,2	164 (60)	11,3	108 (26)	10,0	41 (5)
P ₆	0,5	163 (60)	9,1	147 (49)	3,9	89 (6)
P ₇	0,4	166 (61)	7,2	146 (48)	0,7	68 (9)
P ₈	0,2	160 (61)	9,7	120 (55)	10,7	38 (25)
A ₁	0,4	159 (59)	12,0	132 (58)	0,6	23 (23)
A ₂	0,2	160 (61)	10,9	143 (51)	1,9	30 (16)
A ₃	0,4	162 (61)	9,5	150 (57)	2,2	70 (15)
A ₄	0,6	166 (60)	14,4	141 (46)	10,0	72 (12)

3.2.3. Beziehungen zwischen Bakterientrockenmasse und Pyruvatbildung

Bei diesen Versuchen wurde Nährbouillon mit einem Pyruvatgehalt von ca. 1,0 ppm verwendet. Nach 24stündiger Inkubation bei 30°C wurden bei den neun untersuchten Stämmen Pyruvatkonzentrationen von 2,0 bis 16,5 ppm erreicht. Nach 48 Stunden Bebrütung trat bei vier Stämmen (P₁, P₇, A₁, A₂) eine Pyruvatabnahme um 0,9 bis 6,0 ppm ein, die sich bis zum Versuchsende nach 96 Stunden noch weiter fortsetzte. Bei fünf Stämmen (P₄, P₆, P₈, A₃, A₄) stiegen jedoch die Pyruvatkonzentrationen um 0,6 bis 5,3 ppm nach 48 Stunden Bebrütung weiter an. Danach wurde auch bei diesen Stämmen Pyruvat abgebaut. Nach 96 Stunden war mit Ausnahme von P₈, bei dem noch 3,2 ppm Pyruvat nachzuweisen waren, in keinem Fall über 1 ppm Pyruvat feststellbar. Die Bakterientrockenmasse, deren Werte nach 24 Stunden zwischen 0,03 und 0,19 mg/ml lagen, nahm über die gesamte Versuchsdauer zu und hatte nach 96 Stunden Werte von 0,14 bis 0,40 mg/ml erreicht. Im einzelnen sind die Ergebnisse der Bestimmung von Pyruvat und Bakterientrockenmasse in Tabelle 19 aufgeführt. Die dazugehörigen Keimzahlen gibt Tabelle 20 wieder.

Tabelle 19: Pyruvatgehalt und Bakterientrockenmasse der mit den Stämmen P₁, P₄, P₆ - P₈ bzw. A₁ - A₄ inokulierten Nährbouillon nach Lagerung bei 30°C

Stamm		Pyruvatgehalt (Pyr.) in ppm und Bakterientrockenmasse (BTM) in mg/ml nach Lagerung über			
		24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden
P ₁	Pyr.	9,0	3,0	2,1	0,9
	BTM	0,06	0,06	0,11	0,14
P ₄	Pyr.	16,5	18,2	1,9	1,0
	BTM	0,10	0,14	0,35	0,39
P ₆	Pyr.	3,5	4,8	0,4	0,4
	BTM	0,13	0,15	0,25	0,27
P ₇	Pyr.	7,0	3,5	1,0	0,3
	BTM	0,19	0,24	0,29	0,34
P ₈	Pyr.	6,1	11,4	9,5	3,2
	BTM	0,18	0,20	0,27	0,38
A ₁	Pyr.	5,8	4,6	0,5	0,5
	BTM	0,08	0,16	0,19	0,20
A ₂	Pyr.	9,2	8,3	0,5	0,4
	BTM	0,03	0,09	0,15	0,15
A ₃	Pyr.	6,4	7,0	1,2	0,4
	BTM	0,07	0,11	0,24	0,25
A ₄	Pyr.	2,0	3,5	1,5	0,3
	BTM	0,12	0,23	0,36	0,40

Tabelle 20: Keimgehalt der mit den Stämmen $P_1, P_4, P_6 - P_8$ bzw. $A_1 - A_4$ inokulierten Nährbouillonproben nach Lagerung bei 30°C

Stamm	Keimzahl in $10^6/\text{ml}$ nach Lagerung in			
	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden
P_1	0,13	29	58	112
P_4	9,4	64	121	107
P_6	6,0	135	215	123
P_7	89	133	119	120
P_8	29	30	108	128
A_1	149	480	490	155
A_2	33	49	550	136
A_3	95	148	64	75
A_4	106	460	370	270

Es wurden nach 24 Stunden Keimzahlen von 130×10^3 bis fast 150×10^6 Keimen je ml ermittelt. Je nach verwendetem Stamm stieg die Keimzahl bis zu einer Lagerungszeit von 96 Stunden (P_1, P_8), 72 Stunden (P_4, P_6, A_1, A_2) oder nur 48 Stunden (P_7, A_3, A_4). Maximal wurden 550×10^6 Keime erzielt (A_2 nach 72 Stunden).

Bei der statistischen Auswertung dieser Versuchsergebnisse konnten zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten negative Korrelationskoeffizienten zwischen Keimzahl und Pyruvatgehalt errechnet werden ($r = -0,4$ bis einschließlich 72 Stunden; $r = -0,2$ nach 96 Stunden). Zwischen Pyruvatgehalt und Bakterientrockenmasse wurde zwar bei der ersten Unter-

suchung (24 Stunden Bebrütung) ebenfalls ein negativer Korrelationskoeffizient von $r = -0,4$ festgestellt, danach jedoch wechselte die Art der Abhängigkeit zwischen diesen Parametern sehr stark ($r = -0,15$ nach 48 Stunden; $r = +0,2$ nach 72 Stunden; $r = -0,1$ nach 96 Stunden).

4. DISKUSSION

Durch die veränderten Produktions- und Behandlungsbedingungen von Rohmilch im Erzeugerbetrieb haben die bisher gebräuchlichen Reduktionsproben zur Bestimmung der bakteriologischen Beschaffenheit an Aussagekraft verloren. Auf der Suche nach einer neuen, besser geeigneten Methode haben TOLLE et al. (1972) erstmals in der Pyruvatmessung, mit der die in tiefgeköhlter Milch dominierenden psychrotrophen Keime besonders gut erfaßt werden sollen, eine Möglichkeit zur Bestimmung der hygienischen Wertigkeit von Rohmilch gesehen. Seitdem wird die Frage nach der Anwendbarkeit dieses Parameters häufig diskutiert. Trotz zahlreicher Untersuchungen, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, konnte eine eindeutige Entscheidung bisher jedoch noch nicht getroffen werden. Gerade in letzter Zeit haben sich die Zweifel an der Eignung dieser Methode zur Einführung in die Praxis verstärkt (BUSSE, 1977; LONGMAN et al., 1977; RÖSCHKE, 1977; ZANDSTRA und DE VRIES, 1977).

Um zur Klärung der Frage nach der Beziehung des Pyruvates zur bakteriologischen Beschaffenheit von Anlieferungsmilch beizutragen, sollten in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Pyruvatbildung einiger in Milch vorkommender psychrotropher Mikroorganismen durchgeführt werden. Im einzelnen waren es folgende Untersuchungen:

1. Prüfung von Reinkulturen psychrotropher Mikroorganismen auf Pyruvatbildung bzw. -abbau unter verschiedenen Inkubationsbedingungen;
2. Untersuchungen zur Beeinflussung der Pyruvatbildung durch Zusatz von Pyruvat und L(+)-Laktat;
3. Ermittlung von Beziehungen zwischen Bakterientrockenmasse und Pyruvatbildung in Nährbouillonkulturen.

In orientierenden Versuchen wurde zunächst die Pyruvatbildung von zwölf Psychrotrophen (acht Pseudomonadenstämme, vier Achromobacterstämme) aus der institutseigenen Stammsammlung über 120 Stunden bei

7 und 15°C in hitzebehandelter Milch geprüft. Die Proben zur Bestimmung von Pyruvat und Gesamtkeimzahl wurden, wie in den meisten Versuchen bei HEESCHEN (1972 b), WERNERY (1972), SUHREN (1973) und TOLLE (1973 a), nach jeweils 24 Stunden entnommen. Innerhalb der ersten 48 Stunden dieser Versuche konnte bei allen hier geprüften Stämmen Pyruvatbildung festgestellt werden, wobei am ersten Tag die durchschnittliche Pyruvatzunahme bei niedriger Temperatur (7°C) geringer war als bei höherer (15°C). Am zweiten Tag der Bebrütung war der Pyruvatzuwachs dagegen bei der tieferen stärker als bei der höheren Temperatur. Nach drei Tagen war bei beiden Temperaturen im Mittel nur noch eine sehr geringe Steigerung des Pyruvatwertes zu beobachten (Tabelle 10). Die mittlere Gesamtzunahme des Pyruvats war bei 7°C geringer als bei 15°C. In Einzelfällen (bei den Stämmen P₅, P₇, A₁, A₂ bei 7°C und bei den Stämmen P₂ - P₆ und A₁ bei 15°C) konnte schon nach 48 bzw. 72 Stunden ein Rückgang des Pyruvatgehaltes ermittelt werden, später kam es in vielen Fällen zu starkem Pyruvatabfall, so daß nach frühestens 96 Stunden kein Pyruvat mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu waren auch nach Abschluß der Versuche (120 Stunden) in keinem Versuchsansatz niedrigere Keimzahlen nachzuweisen als zu Beginn der Bebrütung vorhanden waren. Zwischen den einzelnen Pyruvatwerten und den entsprechenden Gesamtkeimzahlen der verschiedenen Stämme konnte dabei keine enge Beziehung festgestellt werden. So enthielten z.B. Ansätze mit Inocula von 5×10^4 bzw. $1,5 \times 10^6$ Keimen/ml nach 48 Stunden 9,3 bzw. 9,0 ppm Pyruvat und 11 bzw. 13 Mio. Keime/ml; ein Ansatz mit einer Keimeinsaat von 1×10^6 Keimen/ml zeigte nach 48 Stunden Lagerung bei einer Keimzahl von 36 Mio./ml dagegen nur 2,7 ppm Pyruvat. Nach HEESCHEN et al. (1977) führt dagegen eine nicht hygienisch gewonnene Milch (d.h. eine Milch mit hoher Anfangskeimzahl) nach längerer Lagerung zu vergleichsweise hohen Pyruvatkonzentrationen. Sie werteten 104.000 Keimzählungsergebnisse und nur 17.038 Pyruvatbestimmungsergebnisse von Anlieferungsmilchproben statistisch aus und ermittelten dabei unabhängig für beide Parameter nahezu übereinstimmende Summenprozentverteilungen. Inwieweit sich allerdings für die einzelnen Milchproben eine gleichwertige Be-

urteilung nach der Keimzählung bzw. der Pyruvatbewertung ergibt, ist aus diesen Untersuchungen nicht ersichtlich. In Übereinstimmung mit Versuchsergebnissen von STAUSS deuten die eigenen Ergebnisse jedoch an, daß weder von der Keimeinsaat auf den später in der Milch sich entwickelnden Pyruvatgehalt geschlossen werden kann, noch umgekehrt der Pyruvatgehalt einer gelagerten Milch eine Schätzung der ursprünglich zur Zeit der Milchgewinnung vorhandenen Keimzahl zuläßt. Auch ZANDSTRA und DE VRIES (1977) sind der Ansicht, daß der Pyruvatgehalt keine zuverlässige Information über den Anfangskeimgehalt liefert, da ein hoher Anfangskeimgehalt ohne starke Vermehrung möglicherweise nur eine undeutliche Pyruvatzunahme zur Folge hat.

Die sehr unterschiedliche Pyruvatbildungsaktivität der geprüften zwölf psychrotrophen Stämme läßt außerdem die Frage offen, inwieweit der Pyruvatgehalt einer Milchprobe als Äquivalent für abgelaufene Stoffwechselvorgänge bzw. Wertminderungen des Substrats herangezogen werden kann. Die Feststellung, Pyruvat sei ein Indikator für die Summe aller bakteriellen Aktivitäten, wird auch von BUSSE (1977) stark angezweifelt.

Unter Berücksichtigung der maximal ca. 44 Stunden dauernden Lagerung von Rohmilch im Erzeugerbetrieb wurden die folgenden Untersuchungen mit zwei Pseudomonaden- und zwei Achromobacterstämmen nur bis zu einer Lagerungszeit von 48 Stunden durchgeführt. Um ein kontinuierliches Bild von der Pyruvatbildung zu erhalten, wurden die Probenentnahmeintervalle auf zwei bzw. vier Stunden verkürzt.

Die Lagerung erfolgte bei 3 bzw. 12°C, die Anfangskeimzahlen betrugen 10^4 Keime/ml (Abbildungen 1 - 4). Bei sehr kalter Lagerung (3°C) ergab sich im zweitägigen Testzeitraum praktisch keine Veränderung des Pyruvatgehaltes in der Milch, obwohl die Keimzahlen langsam anstiegen. STAHLHUT-KLIPP (1974) und WIESNER (1975) berichteten von umgekehrten Verhältnissen: Sie stellten bei Tiefkühlung der

Milch ($< 5^{\circ}\text{C}$) einen Anstieg des Pyruvatgehaltes über einen Zeitraum von 48 bis 72 Stunden fest, obwohl der Keimgehalt der Proben nahezu konstant blieb und erst nach 72 Stunden erhöht wurde.

Dagegen zeigte sich in den eigenen Ergebnissen bei 12°C ein charakteristischer Verlauf der Pyruvatbildung der geprüften Kulturen: Nach einer 14- bis 18stündigen fast inaktiven Anfangsphase – es wurde ca. 1 ppm Pyruvat zugebildet – setzte für 15 bis 20 Stunden eine starke Pyruvatfreisetzung (bis 10 ppm steigend) ein, während die Keimzahlen ohne Verzögerung kontinuierlich anstiegen. Nach zehn Stunden waren schon mindestens 10^5 , nach 28 bis 34 Stunden mehr als 10^7 Keime/ml vorhanden.

Auch bei den sieben aus Rohmilch isolierten Pseudomonadenstämmen konnte unter nicht so starker Keimvermehrung verzögerte Pyruvatfreisetzung festgestellt werden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 6 und bei 12°C . Erwähnenswert ist in dieser Versuchsserie auch, daß bei einem Pseudomonadenstamm (P_9) weder bei 6 noch bei 12°C in 48 Stunden Pyruvatbildung erfolgte, obwohl eine deutliche Keimvermehrung festzustellen war. Bei 6°C nahm die Pyruvatkonzentration sogar geringfügig linear ab. Im übrigen waren bei 6°C nur vier der sieben geprüften Stämme in der Lage, deutliche Pyruvatbildung nach 48 Stunden zu bewirken, bei 12°C dagegen fünf Stämme. Dabei wurde auch hier bei der höheren Lagerungstemperatur eher und stärker Pyruvat gebildet als bei der tieferen Temperatur. Damit konnten die Beobachtungen bei den Laborstämmen auch für Mikroorganismen, die unmittelbar aus landwirtschaftlichen Betrieben stammten, sowie bei Temperaturen, die in der Praxis der Milcherzeugung bei der Lagerung von Rohmilch üblich sind, bestätigt werden.

ELBERTZHAGEN und MENNINGER (1977) kamen bezüglich einer verzögerten Pyruvatfreisetzung durch Mikroorganismen in der Milch zu ähnlichen Ergebnissen. Sie lagerten Rohmilch, die z.T. mit UHT-Milch versetzt war, bei 5°C . Während der Pyruvatgehalt in diesen Milchproben erst

nach zwei bis drei Tagen anzusteigen begann, vermehrten sich die Mikroorganismen kontinuierlich ohne Verzögerungsphase ab Versuchsbeginn.

Zur weiteren Verdeutlichung des Verlaufs der Pyruvatbildung bei verschiedenen Temperaturen wurden die zwölf Psychrotrophenstämmen in kurzen Zeitabständen bis 31 Stunden nach Inokulation auch bei 20°C untersucht. Auch hier war die diskontinuierliche Pyruvatbildung zu erkennen. Die Mehrzahl der untersuchten Stämme zeigte eine wenig aktive Anfangsphase, die allerdings schon nach spätestens sechs Stunden in eine Phase starker Pyruvatbildung überging. Nach 23 Stunden waren in allen Ansätzen 10 bis 17 ppm Pyruvat zugebildet worden. Danach verlief die Pyruvatzunahme weniger steil bzw. trat Pyruvatabnahme ein. Der Keimgehalt nahm bis Versuchsende (31 Stunden nach Versuchsbeginn) kontinuierlich um 3 bis 4 Zehnerpotenzen zu.

Insgesamt geht aus diesem Untersuchungskomplex hervor, daß die Pyruvatbildung psychrotropher Keime einen charakteristischen Verlauf nimmt, der u.a. durch die Lagerungstemperatur beeinflußt werden kann. Je höher die Temperatur ist, desto früher wird – nach einer wenig aktiven Anfangsphase – eine Zeitspanne stärkerer Pyruvatbildung, ein Pyruvatmaximum und eine folgende Pyruvatabnahme erreicht. SUHREN (1973) ist im Gegensatz dazu nicht der Ansicht, daß eine stärkere Abhängigkeit zwischen Pyruvatbildung und Lagerungstemperatur bestehe, so daß auch bei Tiefkühlbedingungen mit erheblicher Pyruvatbildungsaktivität zu rechnen sei. Die eigenen Beobachtungen bezüglich des Verlaufes der Pyruvatbildung stimmen mit denen von ZANDSTRA und DE VRIES (1977) überein, die Tankmilchproben während mehrtägiger Lagerung bei 0,5 und 4°C untersuchten. Dabei konnten sie die gleichen Pyruvatentwicklungsphasen, wie sie in den eigenen Versuchen für 6, 12 und 20°C gezeigt wurden, feststellen. Allerdings wurden die Beobachtungen von diesen Autoren z.T. mehr als zwölf Tage fortgesetzt. Dieser Zeitraum ist jedoch für die Beurteilung von Anlieferungsmilch nicht relevant. In den hierfür

interessierenden 48 Stunden der Lagerungsversuche konnten auch sie nur relativ geringe Pyruvatkonzentrationsänderungen ermitteln. Das in den eigenen Versuchen festgestellte Eintreten einer Pyruvatabnahme nach längerer Lagerung wurde auch von anderen Autoren erwähnt (HEESCHEN, 1971; BRUNS, 1976; ZANDSTRA und DE VRIES, 1977) und mit einer Wiedereinschleusung von extrazellulärem Pyruvat in die Zelle sowie mit einem Freiwerden pyruvatabbauender Enzyme aus zerfallenden Zellen erklärt. Wie aus den eigenen Untersuchungen zum Vergleich von Bakterientrockenmasse und Pyruvatbildung psychrotropher Mikroorganismen in Nährbouillon – allerdings bei 30°C – hervorgeht, kann diese Erklärung bestätigt werden. Denn mit zunehmender Bakterientrockenmasse wurde in den meisten Versuchsansätzen nach 48 Stunden ein sich verstärkender Pyruvatabbau festgestellt. Jedoch wurden zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten stark differierende Korrelationskoeffizienten zwischen diesen Parametern errechnet. Man darf also keine enge Beziehung zwischen Bakterientrockenmasse und Pyruvatgehalt erwarten. Deshalb kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, auch unter definierten Bedingungen die Bakterientrockenmasse als Äquivalent für die Pyruvatbildung heranzuziehen. Allerdings sollten hier noch eingehendere Untersuchungen bezüglich der ersten 48 Stunden der Milchlagerung und der Lagerung der Milch bei Temperaturen unter 10°C folgen.

Inwieweit sich Zugaben von Pyruvat bzw. L(+)-Laktat auf die Pyruvatbildung psychrotropher Mikroorganismen auswirken, sollte in ergänzenden Versuchen geklärt werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen bei 30°C zeigten, daß der Zusatz von 15 mg/Liter Pyruvat die Pyruvatzubildung durch die Bakterien in den ersten 24 Stunden zum Teil verminderte, und in einigen Fällen trat sogar in dieser Zeit schon Pyruvatabbau ein. Während der Zeit zwischen 24 und 48 Stunden war in fast allen Versuchsansätzen mit Pyruvatzusatz eine wesentlich stärkere Pyruvatabnahme festzustellen als in den Parallelansätzen ohne Pyruvatzusatz. Nach 48 Stunden waren die Pyruvatkonzentrationen

in den Parallelansätzen fast gleich niedrig. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von HEESCHEN et al. (1974 und 1977) sowie ELBERTZHAGEN und MENNINGER (1977) wird aufgrund dieser Ergebnisse angedeutet, daß ein erhöhter Anfangspyruvatgehalt in der Milch zu einer verminderten Pyruvatfreisetzung während der Lagerung führen kann. Außerdem kann es in der Phase des Pyruvatabbaus zu verstärkter Eliminierung des Pyruvates kommen, so daß danach nicht mehr unterschieden werden kann, ob in der Milch im Verlauf der Lagerung hohe Pyruvatkonzentrationen vorhanden waren oder nicht. Praktische Bedeutung könnten diese Beobachtungen z.B. für stärker zellhaltige Milch bekommen, die nach TERPLAN und GROVE (1977) schon mit erheblich erhöhtem originärem Pyruvatgehalt ermolken wird. Auch LONGMAN et al. (1977) berichten in diesem Zusammenhang von Pyruvatfreisetzung durch somatische Zellen in der Milch.

Die Versuche mit Milch, der Laktat zugesetzt worden war, wurden wegen der engen biochemischen Beziehung beider Stoffe zueinander durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei Laktatzusatz die Pyruvatentwicklung der untersuchten Mikroorganismen in den ersten 24 Stunden verstärkt wurde. Der Laktatzusatz wurde während der Inkubation stärker abgebaut (von ca. 160 ppm auf ca. 20 - 90 ppm Laktat) als das originär in der Milch vorhandene Laktat (von ca. 60 ppm auf ca. 5 - 25 ppm Laktat). Die Frage, ob das Laktat im Substrat Milch durch extrazelluläre Enzyme abgebaut oder ob es intrazellulär in den Bakterien aufgebraucht wird, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht beantwortet werden. Zu diesem Fragenkomplex müssen noch weitere Ergebnisse, insbesondere für niedrigere Temperaturen, gesammelt werden.

Aus diesen Untersuchungen ergeben sich die nachstehenden Schlußfolgerungen:

Die eigenen Versuche zeigen einerseits, daß unter Einhaltung sehr kalter Lagerungstemperaturen (3°C) das Pyruvatbildungsvermögen der Psychrotrophen sehr stark eingeschränkt werden kann, worauf auch

schon BRUNS (1976) und ZANDSTRA und DE VRIES (1977) hingewiesen haben, so daß mit einer Pyruvatbewertung unter Umständen die Milch nach 48stündiger Lagerung nicht von frischer Milch unterschieden werden kann. Andererseits wird durch die verzögerte Pyruvatfreisetzung zu Anfang der Milchlagerung deutlich, daß über einen Zeitraum von ca. 15 - 20 Stunden, gemessen am Pyruvatgehalt, keine wesentlichen Veränderungen der Milch stattgefunden haben, obwohl die Keimzahlen in dieser Zeit - insbesondere bei 12°C - schon erheblich angestiegen waren. Für die Praxis der Beurteilung von Anlieferungsmilch kann aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, daß Mängel in der Produktionshygiene (hohe Anfangskeimzahlen) durch einen geringen Mehraufwand bei der Kühlung der Milch verdeckt werden können. Auch sind Schwierigkeiten bei der Interpretation der Pyruvatgehalte von Milchproben zu erwarten: Denn durch zufällig unterschiedliche Probeentnahmezeitpunkte (z.B. vormittags oder nachmittags) können sich die Mikroorganismen der Anlieferungsmilch in verschiedenen Pyruvatfreisetzungszuständen - z.B. in der Verzögerungsphase oder in der Phase maximaler Pyruvatzubildung - befinden, obwohl die Keimvermehrung in beiden Phasen mit gleicher Intensität verläuft. Außerdem lassen auch die stark unterschiedlichen Pyruvatbildungsaktivitäten der verschiedenen geprüften Psychrotrophen und die von anderen Autoren häufig festgestellten Diskrepanzen zwischen hohen Pyruvatwerten und niedrigen Keimzahlen daran zweifeln, daß Pyruvat als Grundlage einer gerechten Qualitätsbeurteilung von Anlieferungsmilch eingesetzt werden kann. Allerdings wäre eine ungerechtfertigte Beanstandung der Milcherzeuger im allgemeinen nicht zu erwarten, da hohe Pyruvatwerte, sofern sie nicht durch mangelnde Hygiene verursacht worden sind, auf einen durch Eutergesundheitsstörungen bedingten hohen Sekretionswert zurückzuführen sind.

Ein Teil der - wie vorher erwähnt - mit mangelnder Produktionshygiene arbeitenden Betriebe, in denen die Milch allerdings gut gekühlt wird, würden ohne Beanstandung den Rohstoff belasten. Die Folgen würden sich erst in den Be- oder Verarbeitungsbetrieben bemerkbar machen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

19 Stämme psychrotropher Mikroorganismen (acht Pseudomonaden- und vier Achromobacterstämme aus der institutseigenen Stammsammlung und sieben aus Rohmilch isolierte Pseudomonadenstämme) wurden bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen und -zeiten auf ihr Pyruvatbildungsvermögen in Milch untersucht.

Mit Ausnahme eines Pseudomonadenstammes wurde bei allen Stämmen Pyruvatbildung festgestellt. Allerdings war die Intensität der Pyruvatfreisetzung bei den einzelnen Stämmen sehr unterschiedlich.

Bei einer Lagerungstemperatur von 7°C war die durchschnittliche Pyruvatzunahme am ersten Tag geringer als bei 15°C. Am zweiten Tag dagegen verstärkte sich die Pyruvatbildung bei 7°C, während sie bei 15°C geringer wurde. Nach frühestens 48 bis 72 Stunden war Pyruvatabnahme zu beobachten.

Bei Lagerungstemperaturen von 3, 6, 12 und 20°C wurden die Probenentnahmeintervalle auf z.T. zwei bis vier Stunden verkürzt, so daß die Pyruvatentwicklung kontinuierlich verfolgt werden konnte. Während eines Untersuchungszeitraumes von 48 Stunden veränderte sich der Pyruvatgehalt bei 3°C fast nicht. Eine Anfangsphase ohne deutlichen Pyruvatanstieg erstreckte sich bei 6°C über ca. 24 bis 36 Stunden, bei 12°C über ca. 15 bis 20 Stunden und bei 20°C über ca. zwei bis sechs Stunden. Erst danach kam es zu einer Phase stärkerer Pyruvatfreisetzung, gefolgt von einem Pyruvatmaximum und einer anschließenden Pyruvatabnahme.

Eine enge Beziehung zwischen Pyruvat und Gesamtkeimzahl konnte bei den Untersuchungen nicht festgestellt werden. Wiederholt wurden hohe Keimzahlen bei niedrigem Pyruvatgehalt bzw. niedrige Keimzahlen bei höherem Pyruvatgehalt ermittelt.

Versuche mit Pyruvatzusatz in Milch bei 30°C zeigten, daß unter diesen Bedingungen die Pyruvatbildung der geprüften Stämme in den ersten 24 Stunden der Lagerung z.T. herabgesetzt war, z.T. das zugesetzte Pyruvat sogar schon abgebaut wurde.

Laktatzusatz bewirkte eine Verstärkung der Pyruvatentwicklung über die ersten 24 Stunden der Lagerung. Danach wurde in einigen Versuchsansätzen noch relativ viel Pyruvat nachgewiesen, während der Laktatanteil stärker absank. In den meisten Kulturen sanken dagegen sowohl der Laktatgehalt als auch der Pyruvatgehalt nach 48 Stunden stark ab.

Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Beziehung zwischen Pyruvatbildung und Bakterientrockenmasse von Psychrotrophen in Nährbouillon deuten an, daß die Bakterientrockenmasse als Analogparameter zum Pyruvatgehalt ungeeignet ist.

Die Untersuchungsergebnisse wurden im Hinblick auf die Bewertung von Rohmilch mittels Pyruvatgehalt diskutiert. Vor allem die durch geringe Pyruvatzubildung trotz steigender Keimzahlen gekennzeichnete Phase gibt Anlaß zu Zweifeln, ob das Verfahren eine gerechte Bewertung der Milch ermöglicht.

SUMMARY

19 strains of psychrotrophic microorganisms (8 *Pseudomonas* and 4 *Achromobacter* strains out of the institute's own collection and 7 *Pseudomonas* strains isolated from raw milk) were examined for their ability to produce pyruvate in milk at various temperatures and times of incubation.

Except one *Pseudomonas* all strains proved to produce pyruvate. The intensity of the pyruvate production of the various strains, however, differed considerably.

At 7°C the average increase of pyruvate on the first day was less than at 15°C, whereas on the second day pyruvate production increased at 7°C and lessened at 15°C. After at least 48 to 72 hours a decrease of pyruvate could be observed.

At storage temperatures of 3, 6, 12 and 20°C the intervals of sampling were partly reduced to two to four hours so that pyruvate production could be followed up continuously. During an investigation period of 48 hours the pyruvate content scarcely changed at 3°C. An initial stage without remarkable increase of pyruvate extended at 6°C from about 24 to 36 hours, at 12°C from about 15 to 20 hours and at 20°C from about two to six hours. Only after this a phase of more pyruvate production, a pyruvate maximum and a following pyruvate decrease was reached.

A close correlation between pyruvate and total bacterial count was not registered. Repeatedly high bacterial counts with low pyruvate content and low bacterial counts with higher pyruvate content, respectively, were ascertained.

Trials with pyruvate addition in milk at 30°C showed that under these conditions the pyruvate production of the examined strains in the

first 24 hours of storage was partly reduced, the added pyruvate partly even decreased.

Addition of lactate caused enhancement of the pyruvate formation for the first 24 hours of incubation. After that in some experiments a relatively large amount of pyruvate was found whereas the proportion of lactate diminished more strongly.

Test results concerning the correlation between pyruvate and bacterial dry weight of psychrotrophs in nutrient broth showed that the bacterial dry weight is not suitable as an analogon to pyruvate content.

The results were discussed with regard to valuation of raw milk by means of pyruvate. Especially the phase characterized by a slight pyruvate production in spite of increasing bacterial counts cause doubts whether the method enables an objective valuation of raw milk.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ABO-ELNAGA, I.G. (1966):

Veränderungen des Bakteriengehaltes während der Lagerung von Rohmilch bei verschiedenen Temperaturen.

Arch. Lebensmittelhyg. 17, 125 - 127.

BECK, G. (1972):

Psychrotrophe Organismen in Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 278 - 281.

BECKER, G. (1964):

Über die Haltbarkeitsdauer frisch ermolkenen Milch bei verschiedenen Kühltemperaturen.

Arch. Lebensmittelhyg. 15, 278 - 284.

BOCKELMANN, J. von (1966):

Gesamtkeimzahl und psychrophile Bakterien in tiefgeköhlter Milch.

Milchwiss. 21, 275 - 278.

BRAATZ, R. (1975):

Taxonomie der Pseudomonaden aus Milch.

Milchwiss. 30, 603 - 605.

BRUNS, G. (1976):

Zur Eignung des Pyruvatpools als ein Kriterium zur Förderung und Erhaltung der Güte eintägig angelieferter roher Vollmilch.

Vet.med.Diss., Hannover.

BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG (1969):

Die hygienische Qualität der Rohmilch und Empfehlungen zu ihrer weiteren Verbesserung.

Kieler Milchw. Forsch. Ber. 21, 201 - 356.

BUSSE, M. (1965):

Milchkühlung und Bakterienflora.

Dtsch. Molk.Ztg. 86, 1777 - 1781.

DERSELBE (1977):

Grundlagen der Qualitätskontrolle mit der Pyruvatmethode.

Molk.Ztg. Welt d. Milch 31, 328 - 330 und 495 - 497.

DUCHATEAU, J. und R. LACROSSE (1973):

Behaviour of the bacterial flora in cold-stored milk and cream.

Revue de l'Agriculture (1973) 26, 1063 - 1074.

ref.: Dairy Sci. Abstr. 36, 595.

ELBERTZHAGEN, H. und F. MENNINGER (1977):

Über die Pyruvatbildung der Rohmilchbakterienflora bei niedrigen und hohen Ausgangskeimzahlen und Pyruvatkonzentrationen.

Molk.Ztg. Welt d. Milch 31, 331 - 332.

FRANK, A.H., A. REID, L.M. SANTO, N.A. LUM und S.I. SANDLER (1972):

Similarity in several properties of psychrophilic bacteria grown at low and moderate temperatures.

Appl. Microbiol. 24, 571 - 574.

GRÜN, L. (1969):

Herkunft und Wirkung von *Ps. pyocyanea* in der Milch.

Milchwiss. 24, 14 - 16.

GYLLENBERG, H.G. (1966):

A taxonomic survey of the psychrophilic bacteria in milk and milk products.

Milchwiss. 21, 261 - 265.

GYLLENBERG, H.G., E. EKLUND, G. CARLBERG, M. ANTILA und U. VARTIOVAARA (1963):

Acta Agric. Scand. 13, 177.

zit. nach: THOMAS, S.B. (1966).

HEESCHEN, W. (1971):

Untersuchungen zur quantitativen Analyse und lebensmittelhygienischen Bedeutung bakterieller kataboler Reaktionen in Milch.

Vet.med. Habil.-Schrift, Berlin, Freie Universität.

zit. nach BRUNS, G. (1976).

DERSELBE (1972 a):

Streptokokken - Messung biochemischer Veränderungen.

DVG, Symposium Kiel, Mai 1972.

DERSELBE (1972 b):

Biochemische Veränderungen von Lebensmitteln durch psychrotrophe Mikroorganismen.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 291 - 298.

DERSELBE (1975):

Zur Messung des bakteriellen Katabolismus in Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 13 - 14.

HEESCHEN, W., G. SUHREN und A. TOLLE (1977):

Pyruvatmessung in Milch und Konzept eines Systems zur Erfassung der bakteriologischen Beschaffenheit.

Molk.Ztg. Welt d. Milch 31, 489 - 497.

HEESCHEN, W., J. REICHMUTH, A. TOLLE und H. ZEIDLER (1969):

Zur Bestimmung der psychrotrophen Keimflora in der Anlieferungsmilch.

Milchwiss. 24, 721 - 726.

HEESCHEN, W., A. TOLLE, H. WERNERY und J. REICHMUTH (1972):

Determination of metabolites of bacterial activity in milk.

Technicon International Congress 1972

Advances in Automated Analysis 2, 5 - 14.

HEESCHEN, W., H. WERNERY, G. SUHREN und A. TOLLE (1974):

Zur automatisierten Messung von Fett, somatischen Zellen und Pyruvat in Milch mit Hilfe der kontinuierlichen Durchflußanalyse.

Milchwiss. 29, 394 - 402.

INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1958):

Bestimmung des Keimgehaltes von flüssiger und getrockneter Milch.
Standard 3.

Milchwiss. 1961, 16, 650 - 652.

DERSELBE (1968):

Psychrotrophen-Symposium des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes, Brighton/England.

zit. nach: HEESCHEN, W., J. REICHMUTH, A. TOLLE und H. ZEIDLER (1969).

DERSELBE (1975):

Publication E 21 Psychrotr. Doc. 1/1975.

DERSELBE (1976):

Publication E - Doc. 68 - 1976 - .

JORDANS, F. (1976):

Zur Eignung einer verschärften Alkoholprobe als ein Verfahren zur Bestimmung der mikrobiologischen Beschaffenheit von Rohmilch.

Vet.med. Diss., München.

KIELWEIN, G. (1968):

Feststellung und Bewertung von Pseudomonaden in Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 19, 25 - 29.

DERSELBE (1971 a):

Pseudomonaden und Aeromonaden in Trinkmilch: Ihr Nachweis und ihre Bedeutung.

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 15 - 19.

DERSELBE (1971 b):

Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 22, 29 - 37.

DERSELBE (1972):

Klassifizierung der Gattungen Pseudomonas und Aeromonas.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 281 - 284.

KIELWEIN, G., R. GERLACH und H. JOHNE (1968):

Pseudomonas aeruginosa: Untersuchungen über das Vorkommen in Rohmilch
und die bakteriologische Charakterisierung.
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 146 - 154.

KIELWEIN, G., H. JOHNE und R. GERLACH (1969):

Untersuchungen über einige milchhygienisch bedeutungsvolle biologische
Eigenschaften von Pseudomonaden und Aeromonaden.
Arch. Lebensmittelhyg. 3, 55 - 61.

KIURU, K., E. EKLUND, H. GYLLENBERG und M. ANTILA (1971):

Die proteolytische Aktivität der psychrotrophen Mikroorganismen in der
Hofbehältermilch.
Milchwiss. 26, 138 - 141.

KNAUT, T. (1967):

Die proteolytischen Eigenschaften der Pseudomonas-Arten beim Wachstum
in der Milch.
Milchwiss. 22, 289 - 292.

KNAUT, T. und H. MECH (1972):

Die Hitzeresistenz der Proteasen aus Ps. fluorescens.
Milchwiss. 27, 167 - 170.

KNAUT, T., J. GINEJKO und M. WOJEWÓDZKA (1966):

Einfluß eines zellfreien Filtrats einer Kultur von Ps. fluorescens
auf die biochemischen Eigenschaften von Laktobazillen.
Zesz. Nauk. WSR w Olsztynie 21, 83 - 97.
ref.: Milchwiss. 22, 42.

KRAUS, H. (1960):

Die Proteolyten in der Lebensmittelhygiene.

Arch. Lebensmittelhyg. 11, 90 - 93.

KUNDRAT, W. (1966):

Psychrophile Bakterien in Milch und Milchprodukten.

Arch. Lebensmittelhyg. 17, 160 - 172.

KYNAST, S. (1972):

Qualitätskriterien der Anlieferungsmilch.

Milchwiss. 27, 339 - 341.

LACROSSE, R. (1966):

Caractères caséolytique ou lipolytique des bactéries psychrophiles isolées dans le lait ou les crèmes conservés à basse température.

Milchwiss. 21, 278 - 279.

LAWRENCE, R.C. (1967):

Microbial lipases and related esterases.

Dairy Sci. Abstr. 29, 59 - 70.

LEMBKE, A. (1966):

Temperaturwirkungen auf Mikroorganismen.

Kieler Milchw. Forsch. Ber. 18, 99 - 104.

LEMBKE, A. und F. WASSERFALL (1963):

Zur Kritik des Koch'schen Plattenverfahrens mittels Varianzanalyse.

Kieler Milchw. Forsch. Ber. 15, 269 - 270.

LIMMER, H.-D. (1972):

Über die Keimzahl der von den Milcherzeugern abgelieferten Milch.

Dtsch. Milchwirtschaft 23, 1990 - 1994.

LIMMER, H.-D. und R. WÜBBECKE (1972):

Qualitätsprüfung der Anlieferungsmilch nach einer modifizierten
Ösen-Plattenmethode.

Dtsch. Milchwirtschaft 23, 1027 - 1031.

LONGMAN, A.G., C.M. COUSINS und L.A. MABBITT (1977):

Pyruvate as a measure of bacterial activity in milk.

University of Reading

National Inst. Res. in Dairying, 116 - 117.

LOTT, G. (1972):

Taxonomie und Bedeutung psychrotropher Keime.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 265 - 267.

MALETTE, M.F. (1969):

Evaluation of growth by physical and chemical means.

in: NORRIS, J.R. und D.W. RIBBONS (1969):

Methods in Microbiology, Band I, 521 - 566;

Academic Pres, New York und London.

MARTH, E.H. und W.C. FRAZIER (1957):

J. Milk Food Techn. 20, 72, 79 und 93.

zit. nach: THOMAS, S.B. und B.F. THOMAS (1974).

MIKAWA, K. und T. HOSHINO (1973):

Temperatureinfluß auf die proteolytische und lipolytische Aktivität
psychrotropher Bakterien in Milch.

Japan. J. Dairy Sci. 22, 176 - 186.

ref.: Milchwiss. 29, 369.

MOURGUES, R., L. VASSAL und J. AUCLAIR (1967):

J. Congrès Int. Froid 12, 8 pp.

zit. nach: THOMAS, S.B. und B.F. THOMAS (1974).

MROZEK, H. (1975):

Rohmilchqualität als Ergebnis der Behandlung der Melkanlagen.
Dtsch. Molk.Ztg. 96, 258 - 261.

NAKAE, T. (1970):

Characterization and classification of psychrotrophic bacteria in milk by means of temperature-gradient incubation.
Milchwiss. 25, 161 - 167.

NAKANISHI, T. und T. TANABE (1970):

Studies on psychrotrophic bacteria in cows' milk.
I. Examination of psychrotrophic bacteria in raw milk.
II. Changes of protein in cows' milk by psychrotrophic bacteria during low temperature storage.
Jap. J. Dairy Sci. 19, A 44 - A 50 und A 75 - A 87.
ref.: Dairy Sci. Abstr. 33, 58 und 313.

NAKANISHI, T., T. NAKAE und B.S. RASAN (1967):

Psychrotrophe Bakterien in Rohmilch.
Tohoku J. Agric. Res. 18, 247 - 255.
ref.: Milchwiss. 24, 507.

NASHIF, S.A. und F.E. NELSON (1953):

The lipase of Pseudomonas fragi. II. Factors affecting lipase production.
J. Dairy Sci. 36, 471 - 480.

OVERCAST, W.W. und K. ATMARAM (1974):

The role of Bacillus cereus in sweet curdling of fluid milk.
J. Milk Fd. Techn. 37, 233 - 236.

REUTER, G. (1973):

Zur Systematik hygienisch und technologisch wichtiger Bakterien in der Milchwirtschaft.
Dtsch. Molk.-Ztg. 94, 644 - 655.

RÜSCHKE, R. (1977):

Beziehungen zwischen mikrobiologisch-kulturellem Befund und Pyruvatgehalt der Trinkmilch in Berlin (West) unter besonderer Berücksichtigung der Psychrotrophenflora.

Vet.med.Diss., Berlin.

SCHLEGEL, H.G. (1974):

Allgemeine Mikrobiologie, 3. Auflage.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

SCHMIDT-LORENZ, W. (1972):

Physiologie des Wachstums von Mikroorganismen bei tiefen Temperaturen.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 268 - 272.

SPRINGMEYER, W. (1976):

Zur Bestimmung von Pyruvat und Laktat in roher Milch mit dem Autoanalyzer II.

Vortrag anlässlich der Ausstellung und des Symposiums im US Trade Center, Frankfurt/Main am 27. - 30.1.1976.

SPRINGMEYER, W., R. LÜBENAU-NESTLE und F. BEYER (1976):

Zur Ermittlung der Rohmilchqualität. Bestimmung von Pyruvat und Laktat mit dem Autoanalyzer II.

Dtsch. Molk.-Ztg. 97, 1118 - 1133 und 1195 - 1198.

STADHOUDERS, J. (1975):

Microbes in milk and dairy products. An ecological approach.

Neth. Milk Dairy J. 29, 104 - 126.

STAHLHUT-KLIPP, H. (1974):

Abschlußbericht des Forschungsauftrages "Einsatzmöglichkeiten eines Autoanalyzers zur Untersuchung von Milchproben" der Landesvereinigung der Milchwirtschaft Niedersachsen e.V.

DERSELBE (1975 a):

Zur Methodik der enzymatischen Pyruvat- und Laktatbestimmung aus Milch in der automatischen Durchflußanalyse.

Dtsch. Molk.-Ztg. 96, 622 - 626.

DERSELBE (1975 b):

Zur Methodik der enzymatischen Pyruvat- und Laktatbestimmung in Rohmilch.

Milchwiss. 30, 468 - 470.

STAHLHUT-KLIPP, H. und KRONENBERGER (1975):

Die Eignung der Pyruvatbestimmung zur Beurteilung der hygienischen Wertigkeit der Milch.

Dtsch. Milchwirtschaft 26, 470 - 471.

STANIER, R.Y., N.J. PALLERONI und M. DOUDOROFF (1966):

The aerobic pseudomonades. A taxonomic study.

J. Gen. Microbiol. 43, 159 - 271.

zit. nach: BRAATZ, R. (1975).

STAUSS, H.:

Vet.med. Diss., München,

in Vorbereitung.

SUHREN, G. (1973):

Zur Eignung der enzymatischen Pyruvatbestimmung für die Messung der bakteriellen Belastung von Milch.

Troph. Diss., Bonn.

SUHREN, G., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1975):

Zur Messung des Verderbnisrisikos von Milch.

Milchwiss. 30, 473 - 475.

TERPLAN, G. (1969):

Bakteriologische Probleme bei der Milcherzeugung.

Dtsch. Tierärztebl. 17, 589 - 594.

TERPLAN, G. und H.-H. GROVE (1977):

Persönl. Mitteilung.

THOMAS, S.B. (1966):

Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk.

Milchwiss. 21, 270 - 275.

THOMAS, S.B. und B.F. THOMAS (1974):

Psychrotrophe Bakterien in gekühlter Tanksammelmilch.

Molk.Ztg. Welt d. Milch 28, 101 - 102, 165 - 166, 189 - 190 und 245 - 249.

THOMPSON, D.J. (1960):

A plate loop method for determining viable counts of raw milk.

J. Milk Fd. Techn. 23, 167 - 171.

TOLLE, A. (1973 a):

Pyruvat als zentrale Schlüsselsubstanz des bakteriellen Katabolismus in Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 24, 149 - 154.

DERSELBE (1973 b):

Aktuelle Fragen der künftigen Qualitätsbeurteilung von Roh- und Konsummilch.

Molk.-Ztg. Welt d. Milch 27, 879 - 885.

DERSELBE (1973 c):

Zur Pyruvat-Bestimmung.

Dtsch. Molk.-Ztg. 94, 2008 - 2009.

DERSELBE (1974):

Zur Pyruvat-Bestimmung der Milch.

Molk.-Ztg. Welt d. Milch 28, 12 - 13.

TOLLE, A., W. HEESCHEN, H. WERNERY, J. REICHMUTH und G. SUHREN (1972):

Die Pyruvatbestimmung - ein neuer Weg zur Messung der bakteriologischen Wertigkeit von Milch.

Milchwiss. 27, 343 - 351.

TOLLE, A., H. ZEIDLER und W. HEESCHEN (1968):

Die elektronische Mikrokoloniezählung ein Verfahren zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Qualität der Rohmilch.

Milchwiss. 23, 65 - 70.

VANCURA, V. (1972):

Tiefkühlung der Milch in der Landwirtschaft unter Berücksichtigung einer zweitägigen Milchanlieferung.

Molk.-Ztg. Welt d. Milch 26, 1089 - 1092.

VAN DER ZANT, W.C. und A.V. MOORE (1955):

The influence of certain factors on the bacterial counts and proteolytic activities of several psychrophilic organisms.

J. Dairy Sci. 38, 743 - 750.

WERNERY, H. (1972):

Zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Wertigkeit von Milch durch die quantitative Bestimmung von Pyruvat und die Computer-Bild-Analyse von Plattenkulturen.

Vet.med. Diss., Berlin.

WIESNER, H.-U. (1975):

Zur Aussagekraft des Pyruvatgehaltes in Rohmilch beim Erzeuger.

Milchwiss. 30, 471 - 473.

WOOD, W.A. (1961):

Fermentation of carbohydrates and related compounds.

in: GUNGALUS, I.C. und R.Y. STANIER (1961):

The Bacteria, Band II, 59 - 149,

Academic Press, New York und London.

ZAADHOF, K.-J. und G. TERPLAN (1971):

Zur Eignung einiger Methoden für die Ermittlung der mikrobiologischen Qualität von Rohmilch.

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 129 - 131.

DIESELBEN (1973):

Keimgehaltsbestimmung in der Rohmilch.

Dtsch. Milchwirtschaft 24, Beilage Lebensmittellabor 1/73,

S. III - V.

ZACHARIAH, P. und J. LISTON (1973):

Temperature adaptability of psychrotrophic Pseudomonas.

Appl. Microbiol. 26, 437 - 439.

ZANDSTRA, T. und T.J. DE VRIES (1977):

The pyruvate content in raw milk as an index of its bacteriological quality.

Neth. Milk Dairy J. 31, 109 - 119.

ZEILINGER, A. (1968):

Hebung der Rohmilchqualität vordringlich.

Milchwirtschaftl. Berichte 12, 15 - 18.

ZOLLIKOFER, E. (1973):

Qualitätsfragen zum Rohstoff Milch.

Molk.-Ztg. Welt d. Milch 27, 99 - 104

Verordnungen

Gütebezahlungsverordnung des Landes Baden-Württemberg (1974):

Verordnung des Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Umwelt und des Ministeriums für Wirtschaft, Mittelstand und Verkehr über Prüfung und Bezahlung von Milch.

Vom 4. Juni 1973 i.d.F. vom 6. Juni 1974

GB1. S. 228.

Güteverordnung des Freistaates Bayern (1977):

Verordnung über die Gütebezahlung von Anlieferungsmilch.

Vom 1. April 1977

GVBl. S. 137.

Güteverordnung des Landes Bremen (1976):

Verordnung über Prüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch.

Vom 20. Juli 1965 i.d.F. vom 12. Juli 1976

GBL. S. 178.

Verordnung über die Prüfung und Bezahlung der an Meiereien gelieferten Milch der Freien und Hansestadt Hamburg (1975):

Vom 5. August 1975

GVBl. S. 148.

Güteverordnung des Landes Hessen (1976):

Vom 25. Februar 1966 i.d.F. vom 19. August 1976

GVBl. S. 322.

Güteverordnung des Landes Niedersachsen (1974):

Verordnung über Prüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch.

Vom 17. Dezember 1964 i.d.F. vom 18. Dezember 1974

GVBl. S. 586.

Güteverordnung Milch des Landes Nordrhein-Westfalen (1973):

Verordnung über die Förderung der Güte von Milch und Milch-
erzeugnissen.

Vom 9. April 1963 i.d.F. vom 17. Juli 1973

GV. NW. S. 401.

Güteverordnung des Landes Rheinland-Pfalz:

Landesverordnung über die Qualitätsbezahlung von Anlieferungsmilch.

Vom 26. Mai 1971 i.d.F. vom 31. Oktober 1973

GVBl. S. 333.

Güteverordnung des Saarlandes (1974):

Verordnung über die Bewertung und Bezahlung der Anlieferungs-
milch.

Vom 6. Juni 1974

Amtsbl. S. 591.

Qualitätsbezahlungs-Verordnung des Landes Schleswig-Holstein (1973):

Verordnung über die Prüfung und Bezahlung der an Meiereien geliefer-
ten Milch.

Vom 23. Juli 1964 i.d.F. vom 25. Juni 1973

GVBl. S. 265.

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gern gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit meinen Dank aussprechen.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. H.-H. Grove für seine Hilfsbereitschaft und Beratung bei meinen Untersuchungen und bei der Durchsicht meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Frau H. Schäffer für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung meiner Untersuchungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre immer gern gewährte Hilfeleistung.

Lebenslauf

Am 12. März 1949 wurde ich als fünftes Kind des Diplom-Ingenieurs Karl Arold und seiner Ehefrau Margret, geb. Bundschuh, in Kassel geboren. Nach dem Besuch der Grundschule Brasselsberg von 1955 bis 1959 trat ich in die Heinrich-Schütz-Schule in Kassel ein, wo ich am 19. Juni 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer 1968 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München das Studium der Tiermedizin, das ich am 20. Dezember 1973 mit dem Staatsexamen abschloß. Am 14. Juli 1976 erhielt ich die Bestallung als Tierärztin.



